

Afonso Costa Fernandes Guerreiro Casadinho

**CONTRIBUTO PARA O ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO
DA TUBERCULOSE EM ANIMAIS DE CAÇA MAIOR
E GADO BOVINO NOS CONCELHOS DE MOURA E
BARRANCOS**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Júri

Presidente: Professor Doutor João Requicha

Arguente: Professora Doutora Margarida Simões

Orientador: Professor Doutor João Ribeiro Lima

Co-Orientadora: Professora Doutora Carla Maia

Universidade Lusófona De Humanidades E Tecnologias

Faculdade De Medicina Veterinária

Lisboa

2015

AGRADECIMENTOS

Terminado este trabalho gostaria de agradecer, a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização do mesmo e que sempre me apoiaram ao longo do curso:

Em especial, aos meus pais e ao meu avô Alberto.

Ao Professor Doutor João Ribeiro Lima e à Professora Doutora Carla Maia, meu orientador de dissertação e co-orientadora, respetivamente, pela disponibilidade, conhecimento e experiência profissional, bem como amizade e ajuda demonstradas.

Ao Dr. Derriça Mendes pelo conhecimento e experiência profissional que tem e pelos seus ensinamentos, que foram com certeza uma mais-valia na orientação da presente dissertação.

À Dra. Rute Roda, pela sua disponibilidade e ajuda a organizar os dados estatísticos deste trabalho.

Ao ADS de Moura e Barrancos por me ter fornecido os dados relativamente às explorações de bovinos abrangentes, pois sem os quais não seria possível a elaboração do trabalho.

Aos meus professores que tive desde o Ensino Básico até à Universidade, pois todos eles me transmitiram conhecimentos e opiniões.

A toda a minha família, colegas e amigos que me apoiaram ao longo do meu percurso académico.

RESUMO

A tuberculose bovina é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Mycobacterium bovis* que atinge espécies domésticas, silváticas e o Homem. Como tal, esta doença não só afecta a saúde animal, provocando um grande impacto económico e obstáculo à circulação de animais, como constitui um grave problema para a saúde pública devido ao seu potencial zoonótico. Embora Portugal se encontre numa fase de erradicação da doença em bovinos domésticos, a presença de animais silváticos infetados dificultam os planos de controlo da mesma.

O presente estudo incidiu nos concelhos de Moura e Barrancos no período de Março de 2014 a Fevereiro de 2015, onde foram recolhidos dados de 195 explorações bovinas saneadas, em 10 das quais foram confirmadas focos de tuberculose. Colocou-se a hipótese de transmissão da doença por animais de caça maior (javali e veado) nos 10 focos de tuberculose bovina, uma vez que os dois concelhos em estudo são fortemente povoados por estas espécies. Também foi efetuada a inspeção sanitária em montarias que ocorreram nos concelhos de Moura e Barrancos, inspecionando-se 191 veados e 57 javalis. Em três montarias foram identificadas lesões compatíveis com tuberculose (6 veados, 3,1%; 1 javali 1,8%). Os resultados obtidos confirmam a existência de tuberculose em veados e javalis de vida livre e indicam o potencial de transmissão da doença entre espécies domésticas e silváticas.

PALAVRAS-CHAVE: Tuberculose bovina, Moura, Barrancos, animais de produção e animais de caça maior.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium bovis* that affects domestic species, wild species and Humans. Therefore, this disease not only affects animal health, causing with a significant economic impact and an obstacle to the movement of animals, but due to its zoonotic potential also, represents a serious problem for public health. Although Portugal is in a stage of disease eradication in domestic cattle, the presence of infected wildlife jeopardizes the plans for its control.

This study was performed on the municipalities of Moura and Barrancos from March 2014 to February 2015, with collected data from 195 tested bovine holdings, wherein 10 of which had a tuberculosis outbreak. The possibility of disease transmission by big game animals (wild boar and deer) in the 10 bovine tuberculosis outbreaks was considered, since the two studied municipalities are heavily populated by these animal species. The health evaluation in game hunted animals that occurred in the municipalities of Moura and Barrancos was also performed, where 191 deer and 57 wild boars were inspected. Lesions compatible with tuberculosis were identified in six deer (3.1%) and one boar (1.8%) caught, in three hunts, later confirmed to be tuberculosis (6 veados, 3,1%; 1 javali, 1,8%). The results confirm the existence of tuberculosis in free-ranging deer and wild boars and indicate the potencial for disease transmissions between domestic and wild species.

KEY WORDS: Bovine tuberculosis, Moura, Barrancos, farm and big game animals.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADS- Agrupamento de Defesa Sanitária

BAAR- Bacilos Ácido-Álcool Resistentes

ADN- Ácido Desoxirribonucleico

DGAV- Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DSRV- Direção de Serviços Regionais de Veterinária

ELISA- Enzyme-Liked Immunosorbent Assay

IDTC- Intradermotuberculinização comparada

INIAV- Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

ITS- Internal Transcribed Spacer (Espaço Interno Transcrito)

MTC- Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

M. spp- *Mycobacterium. spp*

NAV- Núcleo de Alimentação e Veterinária

OPP- Organização dos Produtores Pecuários

PE- Plano de Erradicação

PCR- Polymerase Chain Reaction (Reacção em Cadeia de Polimerase)

RD- Regiões de Diferença

rDNA- Ácido Desoxirribonucleico Ribossomal

rRNA- Ácido Ribonucleico Ribossomal

TB- Tuberculose Bovina

ZN- Ziehl-Neelsen

ÍNDICE GERAL

RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE ABREVIATURAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABELAS	10
ÍNDICE DE GRÁFICOS	11
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1. 1 INTRODUÇÃO	13
1. 2 PERSPECTIVA HISTÓRICA DA TUBERCULOSE	14
1. 3 ETIOLOGIA	16
1. 3. 1 CARACTERÍSTICAS GERAIS E CLASSIFICAÇÃO	17
1. 3. 2 FILOGENIA DO COMPLEXO <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
1. 4 TUBERCULOSE BOVINA	20
1. 5 VIAS DE INFECÇÃO E DE TRANSMISSÃO	20
1. 6 PATOGENIA	21
1. 7 SINAIS CLÍNICOS	22
1. 8 DIAGNÓSTICO	23
1. 9 DETECÇÃO DE LESÕES COMPATÍVEIS COM TUBERCULOSE	24
1. 9. 1 ACHADOS CLÍNICOS À LESÃO.....	24
1. 9. 2 MÉTODO BACTERIOLÓGICO	26
1. 9. 3 MÉTODOS MOLECULARES	27
1. 10 FATORES DE RISCO	28
1. 11 SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA	30
1. 12 TUBERCULOSE EM ESPÉCIES SILVÁTICAS	36
2. OBJETIVOS	40

3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 CASOS DE TUBERCULOSE EM BOVINOS E EM ESPÉCIES DE CAÇA MAIOR	41
3. 1.1 ATIVIDADE I- FOCOS DE TUBERCULOSE NO NÚCLEO DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA DE SERPA	41
3. 1. 1. 1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO EM ESTUDO	41
3. 2 SANEAMENTO DE GADO BOVINO NOS CONCELHOS DE MOURA E BARRANCOS E CARACTERIZAÇÃO DAS EXPLORAÇÕES COM FOCOS DE TUBERCULOSE	42
3. 3. ATIVIDADE II - ACOMPANHAMENTO DAS SEIS MONTARIAS	43
3. 3. 1 CARACTERIZAÇÃO DAS ZONAS DE CAÇA	43
3. 3. 2 INSPEÇÃO SANITÁRIA DE CAÇA MAIOR EM MONTARIAS REALIZADAS NOS CONCELHOS DE MOURA E BARRANCOS	44
3. 3. 2. 1 INSPEÇÃO MACROSCÓPICA	45
3. 3. 2. 2 RECOLHA DE AMOSTRAS DE TECIDOS COM LESÕES COMPATÍVEIS COM TUBERCULOSE	45
4. RESULTADOS	47
4. 1 ATIVIDADE I- FOCOS DE TUBERCULOSE EM BOVINOS NO NÚCLEO DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA DE SERPA	47
4. 1. 1 CARACTERIZAÇÃO DAS EXPLORAÇÕES COM FOCOS DE TUBERCULOSE	47
4.2 ATIVIDADE II - ACOMPANHAMENTO DAS SEIS MONTARIAS	49
4. 2. 2 INSPEÇÃO MACROSCÓPICA E RECOLHA DE AMOSTRAS.....	50
5. DISCUSSÃO	52
5. 1 ATIVIDADE I- FOCOS DE TUBERCULOSE NO NÚCLEO DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA DE SERPA	52
5. 2 ATIVIDADE II- ACOMPANHAMENTO DAS SEIS MONTARIAS.....	55
6. CONCLUSÃO.....	58
BIBLIOGRAFIA	60

ANEXOS	I
ANEXO I:	I
ANEXO II:	II
ANEXO III:	III
ANEXO IV:	VI
ANEXO V:	VII

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução filogenética do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	18
Figura 2 - Conteúdo purulento após incisão num linfonodo traqueo-brônquico de um veado.	25
Figura 3 - Exemplos de vedações a delimitar as explorações pecuárias.	29
Figura 4 - Ação de tuberculinização a um efetivo bovino.....	34
Figura 5 - Interpretação dos resultados à reação da prova da tuberculina aviária AA (<i>M. avium</i>) em comparação com as medidas da reação à prova da tuberculina mamífera AB (<i>M. bovis</i>).	35
Figura 6 - Análise dos padrões de spoligotyping, em que é possível verificar a partilha destes entre animais de produção e silváticos.	37
Figura 7 - Javalis e bovinos numa área comum.	41
Figura 8 - Esquema demonstrativo das áreas epidemiológicas de risco para a tuberculose dos animais de caça maior em Portugal.	43
Figura 9 - Javalis em fuga durante uma caçada.....	44
Figura 10 - Reses abatidas no final da montaria aptas a serem inspeionadas pelo médico veterinário designado.....	44
Figura 11 - Evisceração de um veado.....	45
Figura 12 - Identificação da rês com o selo fornecido pela DGAV.	46
Figura 13 - Localização dos focos ativos de tuberculose no Núcleo de Alimentação e Veterinária de Serpa, entre Março de 2014 a Fevereiro de 2015.	47
Figura 14 - Exploração onde coabitam bovinos e ovinos.	48
Figura 15 - Inspeção macroscópica a três veados	50
Figura 16 - Localização geográfica das seis montarias realizadas nos concelhos de Moura e Barrancos.....	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Animais de montaria com lesões compatíveis com tuberculose	51
--	----

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição do número de bovinos saneados por dimensão da exploração	42
Gráfico 2 - Distribuição das explorações com e sem bovinos infetados, que coabitam ou não com ovinos/caprinos nos concelhos de Barrancos e Moura respetivamente.....	48
Gráfico 3 - Prevalência de tuberculose em javalis e veados, de acordo com o sexo, idade e localização (concelho)	49

ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular decorreu durante um período de seis meses (de Outubro de 2014 a Março de 2015), na área de clínica de espécies pecuárias, em duas zonas distintas do País: uma fase nos concelhos de Moura e Barrancos e outra no concelho de Odemira.

Durante o estágio deparei-me várias vezes com ações de erradicação de tuberculose bovina em efetivos de bovinos de carne, bem como com a aplicação de medidas profiláticas e sanitárias a aplicar sempre que surge um animal suspeito de tuberculose. Durante a parte do estágio que decorreu nos concelhos de Moura e Barrancos tive a oportunidade de acompanhar um Médico Veterinário responsável pela inspeção de reses de caça maior (veados e javalis) abatidas em montarias, e fazer a recolha de amostras compatíveis com lesões de tuberculose, tendo estas sido utilizados para o desenvolvimento da parte prática da presente dissertação. De referir, que estes dois concelhos estão incluídos na área epidemiológica de risco para a tuberculose dos animais de caça maior (javalis, veados, gamos, muflões e corços) (DGAV, 2011b).

De um modo geral, posso concluir que o estágio realizado foi bastante produtivo, e não só pela aplicação prática de competências teóricas, como pelo conhecimento da realidade profissional praticada nas diferentes regiões. Uma vez que tive a oportunidade de o fazer em duas regiões bastante distintas no que respeita quer ao maneio, quer às competências médico-veterinárias com as espécies pecuárias, permitiram-me a obtenção de conhecimentos que irão certamente ser úteis em toda a minha carreira profissional.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. 1 INTRODUÇÃO

A tuberculose foi considerada durante muito tempo a “doença contagiosa mais terrível que afetou a humanidade” (Blancou, 2003).

É considerada uma doença infecciosa emergente, causada por micobactérias patogénicas, e tem vindo a provocar não só graves danos a nível de saúde humana e animal, causando um grande impacto económico e restrição nas movimentações de animais (Humblet, 2009).

A tuberculose é uma zoonose de difusão mundial, caracterizada geralmente por evolução crónica, e os animais infectados podem nunca chegar a apresentar sinais clínicos. A doença afeta vários órgãos, em especial pulmões e linfonodos, e as lesões provocadas caracterizam-se, regra geral, pelo desenvolvimento de pequenos nódulos de tecido inflamatório (Davis *et al.*, 1973). Um só animal infetado, durante a sua vida, pode infetar um número indeterminável de outros animais (Ameni, 2007; Fonseca, 2011). O controlo desta doença assenta na identificação e remoção dos animais infetados (Clifton-Hadley, 2006).

A tuberculose bovina é uma doença infetocontagiosa, naturalmente transmissível dos animais ao homem e que faz parte da lista de doenças de declaração obrigatória nacional desde 1953 e da lista de doenças notificáveis à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (DGAV, 2011a). Desde os finais da década de 80, os países desenvolvidos iniciaram a implementação de um programa periódico de controlo e erradicação da tuberculose no gado bovino. Contudo, a taxa de sucesso ao nível da erradicação não tem sido a mais satisfatória devido não só ao aumento do número de efetivos de animais bovinos como ao aumento do número de animais silváticos, suscetíveis à tuberculose bovina, que por definição são animais de vida livre, em que o controlo de doenças é mais complicado (Collins, 2001).

A tuberculose encontra-se reportada em várias espécies de animais silváticos, tais como o texugo (*Meles meles*) em Inglaterra, o veado de cauda branca (*Odocoileus virginianus*) nos EUA, javalis (*Sus scrofa*) em Espanha e o búfalo do Cabo (*Syncerus caffer*) na África do Sul (Collins, 2001).

A eventual hipótese dos animais silváticos serem afetados por estirpes de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) comuns aos animais de produção, desempenhando dessa forma o papel de potenciais reservatórios responsáveis pela reintrodução da doença em explorações livres de tuberculose, tem sido um tema muito debatido em vários países (Duarte *et al.*, 2007). Em Portugal, a informação obtida através de inquéritos epidemiológicos apenas indica a

provável existência de transmissão do agente patogénico entre as espécies silváticas e os animais de produção, sendo necessário recorrer ao apoio de dados moleculares para confirmar se existem ou não relações epidemiológicas entre as estirpes isoladas (Duarte *et al.*, 2007). Dezanove dos concelhos de Portugal, incluindo os de Moura e Barrancos, encontram-se inseridos na área de risco de tuberculose por apresentarem valores de prevalência da doença elevados. Estes valores são confirmados a partir dos programas de erradicação aplicados em bovinos assim como das inspeções sanitárias realizadas em animais silváticos abatidos em caçadas (DGAV, 2011).

Como tal, este trabalho tem o intuito de contribuir para uma melhor compreensão da epidemiologia da tuberculose em animais silváticos e bovinos, sobretudo nos concelhos de Moura e Barrancos. Deste modo foi feita uma descrição que incide essencialmente nos aspectos principais da doença, de modo a enquadrar a componente prática realizada. Esta última foi dividida em duas partes, baseando-se a primeira num estudo de casos de tuberculose em bovinos e a segunda na pesquisa desta doença em espécies de caça maior (javali e veados).

1. 2 PERSPECTIVA HISTÓRICA DA TUBERCULOSE

Com base em lesões encontradas em esqueletos de humanos pré-históricos confirmou-se a presença de tuberculose, como descrito no Código de Hammurabi, datado com o ano de 2000 a. C., e em literatura índio-árabe, datada com o ano de 1500 a. C. (Bron, 1941; Moorman, 1940; Davis *et al.*, 1973). A tuberculose animal remete para a mesma distância temporal, como descrito por Iyer (1937) em elefantes indianos, que já existia por volta do ano de 2000 a.C. (Davis *et al.*, 1973).

Para os gregos e romanos, a tuberculose era um assunto muito falado, colocando-se a hipótese de serem estes os povos pioneiros no que respeita à sua disseminação (Davis *et al.*, 1973). Séculos mais tarde, a Grã-Bretanha foi um exemplo de um povo que foi fortemente afetado, bem como a Dinamarca e outros países escandinavos, devido ao tráfico entre ambos os povos, datado no século XVIII. Essa disseminação estendeu-se para o continente americano, devido, quer à emigração dos povos quer à movimentação (Davis *et al.*, 1973).

Pensa-se que a tuberculose tenha aparecido inicialmente em animais e só depois em humanos. Uma vez que o aparecimento da doença em humanos ocorreu num intervalo de tempo muito curto, em relação aos animais, pensa-se que o seu aparecimento se deva quer ao contato

direto do Homem com mamíferos terrestres, e pela ingestão de carne e produtos contaminados (Hubbert *et al.*, 1975).

As reações granulomatosas provocadas nos animais, conhecida na altura como a “doença da pérola” em bovinos, foi comparada desde o século XVI com a sífilis em humanos, o que fez com que começasse a surgir uma possível transmissão entre os animais e os humanos. Por conseguinte, houve uma quebra no consumo de carne de bovino até finais do século XVIII. Por sua vez, Virchow e Röhl, negaram a existência de tuberculose em animais, afirmando que os granulomas pulmonares e as neoformações das membranas serosas eram sarcomas semelhantes aos linfossarcomas no Homem. As lesões tuberculosas eram muitas vezes diagnosticadas como abscessos, granulomas, sarcomas e sífilis (Hubbert *et al.*, 1975; Ferreira & Ferreira 1990; Jesus, 2013).

Laënnec, em 1819, descreve em animais processos caseosos, exsudativos e granulomatosos em pulmões e linfonodos, o que o levou a suspeitar que a sua origem pudesse estar na base de um microrganismo responsável pelo aparecimento da tuberculose (Hutra *et al.*, 1953). Por sua vez, Virchow, em 1847, descreve o conceito da tuberculose com base em investigações histológicas, referindo que apenas se poderia suspeitar da doença caso houvessem formações granulosas exuberantes, isoladas ou em grupos, destituídas de irrigação sanguínea ou com focos de necrose de caseificação das ditas granulações (Hutra *et al.*, 1953; Jesus, 2013).

Anos mais tarde, em 1865, Villemin afirma na sua obra *Etudes sur la Tuberculose*, que se trata de uma doença infectocontagiosa, com base em experimentações feitas em coelhos e cobaias a partir da inoculação de substância obtida de lesões em vacas e humanos, adiantando que em bovinos a virulência provocada era superior (Abrahão, 1998). Ainda assim, não era conhecida a etiologia específica da doença (Hutyra *et al.*, 1953; Davis *et al.*, 1973; Waters *et al.*, 2014). Foi em 1882, que Robert Koch identificou o agente responsável pela doença tanto em humanos como em animais: o bacilo de Koch. Oito anos mais tarde, em 1890, Robert Koch desenvolveu a tuberculina com finalidade terapêutica. Essa finalidade não foi conseguida, mas veio mais tarde a revelar-se como um meio de diagnóstico precioso da doença (Hutyra *et al.*, 1953), através da prova da tuberculina, PPD (Derivado Proteico Purificado), preparada a partir de filtrado de cultura de uma estirpe de laboratório de *M. bovis*.

Ainda em 1890, Maffuci foi quem caracterizou o bacilo da tuberculose aviária, posteriormente denominado *Mycobacterium avium* (*M. avium*) (Davis *et al.*, 1953). Entre 1896 e 1898 foi reportado que o bacilo da tuberculose em bovinos era diferente do humano tendo em conta a natureza e causa da doença, assim como a sua onnipresença e capacidade de adaptação a um número variado de hospedeiros vertebrados. Ainda que ambos os bacilos fossem da

mesma espécie distinguiam-se pelas suas propriedades secundárias, como morfologia e patogenia (Hutyra *et al.*, 1953). Relativamente à profilaxia desta doença, foram nomes como Bang e Behring que lutaram por ela, todos sem resultados fidedignos (Llamazares, 1999; Blancou, 2003).

Outra importante descoberta foi a distinção entre três tipos de bacilos, na conferência internacional da tuberculose realizada em Londres (1901). O bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) era responsável por grande parte da doença em humanos, o bacilo *M. bovis* pela doença no gado e o bacilo *M. avium* nas aves, além de existirem outras micobactérias saprófitas e ambientais. Foi reconhecido que *M. bovis* também poderia ser encontrado em humanos. Mais tarde, confirmou-se que a sua transmissão poderia ocorrer não só pela ingestão de produtos contaminados, como por via aerógena, quando se comprovou que a inalação de *M. bovis* em estábulos poderia provocar todos os sintomas a que a esta doença dizem respeito (Abrahão, 1998; Jesus, 2013).

Calmette e Guérin, em 1924, conceberam uma vacina contra a tuberculose, que designaram de BCG (Bacillus of Calmette-Guerin) com o objetivo de atenuar o bacilo *M. bovis*, quer em animais de produção, quer em humanos. Contudo, os resultados não foram os mais desejados, para além de interferir com o teste da tuberculina. Mais tarde em 1959, a comissão de especialistas da OIE e da Organização Mundial de Saúde (OMS) defendeu que a vacinação não constituía um contributo para a erradicação da doença (Collins, 2001; Waters *et al.*, 2014).

1.3 ETIOLOGIA

M. tuberculosis é o agente etiológico da tuberculose em humanos, embora o agente patogénico *M. bovis*, específico em animais, também possa infetar o Homem, como já referido anteriormente. Estes agentes e outros tais como *M. africanum*, *M. microti* (Llamazares, 1999), *M. canettii* (van Sooligen, 2001), *M. caprae* (Aranaz *et al.*, 2003) e *M. pinnipedii* (Cousins *et al.*, 2003) constituem o complexo de micobactérias patogénicas, denominado de Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) (Abalos & Retarnal, 2004).

Apesar de *M. tuberculosis* e *M. bovis* apresentarem uma homologia genética de 99,9%, o que tem dificultado o desenvolvimento de técnicas específicas de diagnóstico e tipificação, as duas espécies divergem na epidemiologia, patogenia, hospedeiros e em RFLPs, bem como os que codificam a parede celular (Brosch *et al.*, 2001; Abalos & Retarnal, 2004; Duarte *et al.*, 2007). Tudo aponta para que *M. bovis* e *M. tuberculosis* partilhem um ancestral comum, pelo

estudo comparativo dos seus genomas, particularmente quanto às suas deleções presentes em *M. bovis* relativamente a *M. tuberculosis* (Brosch *et al.*, 2002; Mostowy *et al.*, 2002). De todas as micobactérias patogénicas pertencentes ao MTC, *M. bovis* é a espécie que apresenta um maior espectro de hospedeiros (Whipple & Palmer, 2000; Sola *et al.*, 2001; Abalos & Retamal, 2004).

1. 3. 1 CARACTERÍSTICAS GERAIS E CLASSIFICAÇÃO

As micobactérias são bacilos imóveis, de crescimento lento, intracelular obrigatório, não esporulados, aeróbios, ácido-álcool resistentes, à semelhança do agente da lepra (bacilo de Hansen), da paratuberculose em bovinos e também com certos saprófitas (Ferreira, 1957). Uma característica que diferencia este género é o fato de apresentar GC numa percentagem de 61 a 71 % no seu genoma (Cole *et al.*, 1998). Em preparações microscópicas apresentam-se sob a forma de bastonete delgado reto ou ligeiramente curvo, entre 2 a 5 microns de comprimento, por 0,3 a 0,5 microns de espessura, que muitas vezes apresentam espaços incolores ao longo da sua extensão (Ferreira, 1957). A natureza da parede celular dos agentes do género *Mycobacterium* influencia tanto as técnicas de coloração como a resistência aos desinfetantes, ácidos e à dessecação, bem como o crescimento lento e hidrofóbia em meios líquidos, o que leva a que sejam considerados como bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (Jesus, 2013).

O género *Mycobacterium* tem diferentes classificações consoante os critérios a considerar como a velocidade de crescimento (rápida, se inferior a 7 dias e, lenta se superior a 7 dias, sendo esta a mais comum nas espécies patogénicas), a produção de pigmentos, a temperatura ótima de crescimento e o aspeto morfológico das colónias (rugosas ou lisas) (Quinn *et al.*, 2004).

1. 3. 2 FILOGENIA DO COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis*

A origem e progressão do MTC ainda não estão totalmente clarificadas. Com base em análises realizadas em ambas as espécies, é possível comprovar que as espécies *M. bovis* e *M. tuberculosis* terão derivado do mesmo ancestral, sem que nenhuma tenha evoluído a partir da outra (Sola, 2001). Foi possível confirmar uma evolução independente através da supressão de certas sequências do genoma, que lhe conferiram a característica de apresentar tropismo para um amplo e diverso leque de hospedeiros. Segundo outras fontes mais recentes, a espécie *M.*

tuberculosis sofreu deleções e inserções de ácido desoxirribonucleico (DNA), a partir de então foram surgindo novas estirpes evolutivas (Grange, 2009).

Toda esta especificação foi apoiada na reunião de características fisiológicas, epidemiológicas, bioquímicas, genéticas e de crescimento específicas para o respetivo agente, como capacidade de virulência, gama de hospedeiros suscetíveis e distribuição geográfica a que melhor se adaptam sem que sofram mutações que os impeçam de se expressar (Figura 1) (Brosch, 2001; Mostowy *et al.*, 2005).

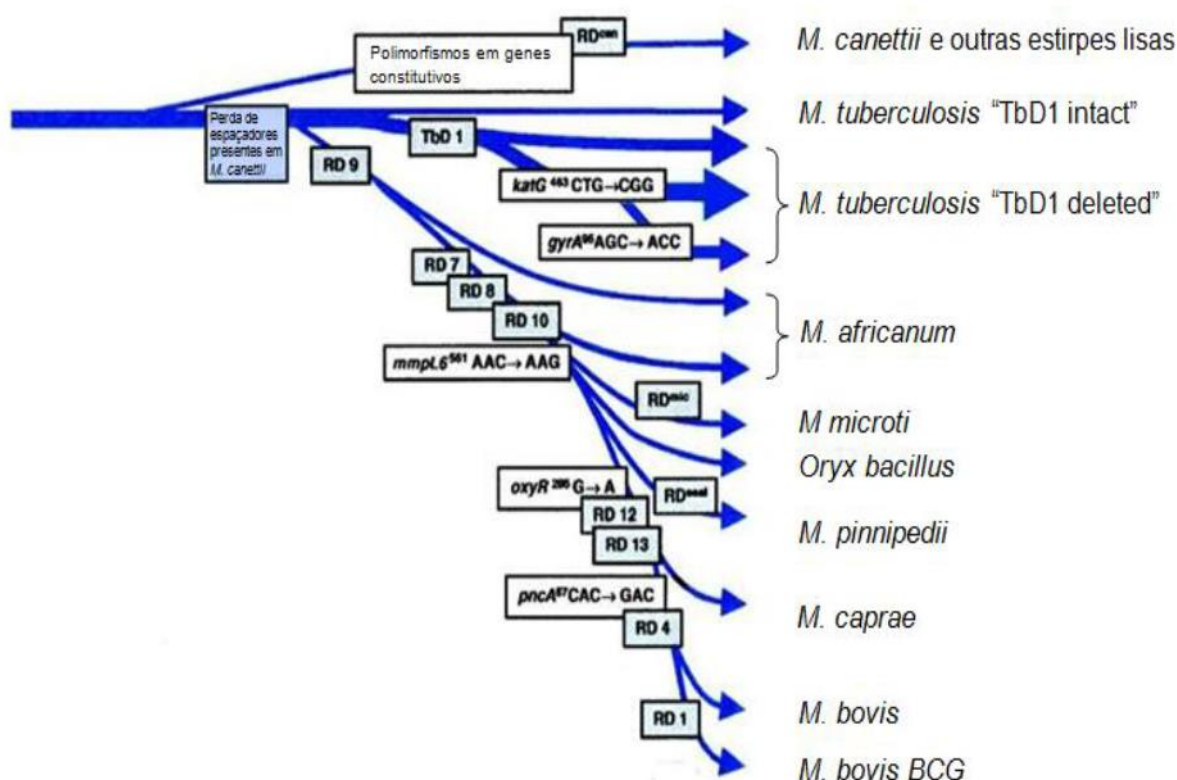


Figura 1 - Evolução filogenética do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (adaptado de Brosch *et al.*, 2002)

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* é formado por sete espécies, que partilham uma certa homologia. A distribuição das regiões deletadas agrupa diferentes organismos consoante o seu genoma, sendo então possível elaborar uma estratificação filogenética com base em características genotípicas e fenotípicas das espécies que compõem o MTC (Brosch *et al.*, 2001; Rothschild, 2001; Van Sooligen, D, 2001; Niemann, S 2002; Mostowy, S 2005; Huard, R,C 2006):

-*M. tuberculosis* - este agente afeta essencialmente humanos, embora também possa afetar primatas, cães, gatos e cavalos, em contacto com o homem (Rastogi *et al.*, 2001).

-*M. bovis* - ainda que seja o agente específico da tuberculose em bovinos, abrange uma vasta gama de hospedeiros como mamíferos selvagens e domésticos, e o Homem por transmissão a partir destes animais (Radostits *et al.*, 2000; Brosch *et al.*, 2001).

-*M. caprae* - tem como hospedeiros principais os caprinos, podendo também afetar ocasionalmente bovinos. Com base nas características bioquímicas e genéticas esta espécie foi inicialmente considerada como subespécie de *M. tuberculosis*, depois passou a ser de *M. bovis* (Niemann, 2002), vindo-se mais tarde a comprovar a distinção de entre estes genótipos (Bezoz, 2014).

-*M. africanum* - foram isoladas estirpes desta espécie em algumas regiões do Ocidente e de Leste de África sendo responsável por infetar roedores e mamíferos, incluindo o ser humano (Rastogi, 2001; Brosch, 2002).

-*M. pinnipedi* - responsável por afetar algumas espécies de leões-marinhos e focas (Costa *et al.*, 2014).

-*M. microti* – tem como hospedeiros pequenos roedores, essencialmente, ratos e ratazanas (Schinnick, 1994). Este agente tem a mesma virulência que a BCG, chegando mesmo a terem sido utilizados os dois em conjunto como vacina (Grange, 2009).

-*M. canettii* - foram relatados casos em humanos na República de Djibuti, embora não tenham sido descritos casos de contágio entre eles (Fabre, 2010). Esta espécie é das que mais se aproxima do ancestral *M. tuberculosis*, tendo em consideração a morfologia, a patogenia dos seus bacilos e os hospedeiros (Brosch, 2002).

Com o progresso das investigações científicas aumentou a descoberta de novas espécies tais como o *M. mungi* recentemente isolado numa população de Mangustos, no Botswana. Esta micobactéria, é responsável por elevadas taxas de mortalidade nestes carnívoros e caracteriza-se pela rápida propagação. Ainda não é conhecido ao certo qual o espectro de hospedeiros que abrange bem como a sua dinâmica de transmissão, mas sabe-se que tem uma progressão extremamente rápida com taxas de mortalidade elevadas (Alexander, 2010).

1. 4 TUBERCULOSE BOVINA

1. 5 VIAS DE INFECÇÃO E DE TRANSMISSÃO

A transmissão do agente ocorre geralmente por via respiratória ou por via digestiva e menos frequentemente por soluções de continuidade na pele ou mordeduras. Conforme a porta de entrada, varia o local onde os microrganismos se instalam, nomeadamente faringe, brônquios ou intestinos (linfonodos mesentéricos) (Goodchild & Clifton-Hadley, 2001).

Assim, os bovinos podem infetar-se por diversas vias, podendo a transmissão ser influenciada pela idade, manejo e clima (de Kantor, 2008). Os bacilos excretados em forma de aerossol são a principal forma de infecciosidade, uma vez que podem contaminar diretamente outros animais, assim como pastagens e pontos de abeberamento. A infecção por inalação ocorre principalmente por contato direto com o animal infetado, podendo também resultar da aspiração de partículas em pastagens contaminadas, de gotículas de água contaminadas e inalação de poeiras. Como tal, a infecção nos bovinos é principalmente uma infecção do trato respiratório pelo que as lesões são geralmente mais evidentes no sistema respiratório superior e inferior, e linfonodos associados. (O' Reilly & Daborn, 1995; Pollock *et al.*, 2005 Rua-Domenech *et al.*, 2006). Outra das formas de infecção é através de excreções, tais como: fezes, urina, secreções de animais infetados provenientes de episódios de tosse, leite, secreções nasais, e material purulento proveniente dos linfonodos periféricos (Philips *et al.*, 2003; Humblet *et al.*, 2009). Ainda assim, mesmo numa fase inicial e sem lesões visíveis, pode haver excreção de micobactérias viáveis poucos dias após a infecção (Pollock *et al.*, 2006).

A infecção por via digestiva ocorre através da ingestão de cadáveres infetados, leite infetado, de água e alimentos contaminados (Radostits *et al.*, 2000). Em condições naturais, a água de beber, quando estagnada, pode causar a doença até 18 dias após o último uso por um animal tuberculoso (Plana, 2004).

Com base em estudos realizados, constatou-se que cerca de 6 a 10 bacilos são suficientes para infetar um bovino por inalação, no entanto a dose necessária para infetar um bovino por via digestiva é muito superior (Rua-Domenech *et al.*, 2006).

Ainda que menos vulgar, também pode haver transmissão por via intrauterina, via sexual, em casos de inseminação artificial quando as pipetas estão contaminadas ou também por via intramamária, por contaminação do material de ordenha (Hutyra, Marek & Manninger, 1953; Radostits *et al.*, 2000).

De salientar, que o agente é consideravelmente resistente em climas temperados podendo permanecer viável cerca de seis meses, desde que esteja protegido da dessecação pelo solo e material fecal (Menzies & Neill, 2000; Palmer & Waters, 2006).

1. 6 PATOGENIA

A infecção por bactérias do género *Mycobacterium*, desencadeia uma resposta imunológica de hipersensibilidade do tipo IV (hipersensibilidade tardia) no hospedeiro, que atinge um pico máximo entre as 48 e 72 horas após a entrada do agente no organismo. Esta resposta é essencialmente celular, com a ativação do sistema mononuclear fagocitário. Após fagocitose pelos macrófagos locais, as micobactérias inibem a fusão do fagossoma com o lisossoma, conseguindo sobreviver no interior da célula hospedeira (Jesus, 2011; Biberstein & Hirsh, 2004). As micobactérias acabam por destruir o macrófago e são libertadas nos tecidos. Consequentemente, há um aumento do número de macrófagos no local da infecção para destruir as micobactérias em multiplicação (Whipple & Palmer, 2000, Pollock *et al.*, 2006, Skoric *et al.*, 2007). Este aumento progressivo dos macrófagos, desencadeia uma reação que faz com que se apresentem antígenos, ativando uma resposta imunitária mediada por linfócitos T CD4+, que libertam citocinas, principalmente interferão- γ (IFN- γ) responsável pela inibição do crescimento dos bacilos e pela ativação dos macrófagos que assumem a forma de células epitelióides ou células gigantes de Langerhans. Nas regiões onde estão os macrófagos que foram ativados pela resposta imunitária, há uma agregação de linfócitos e monócitos que se dispõe pela sua periferia, que em seguida é encapsulada adotando a forma do característico granuloma da tuberculose. Os linfócitos T CD8+ fazem a lise dos macrófagos infetados (Whipple & Palmer, 2000; Neill *et al.*, 2001; Tizard, 2002; Pollock *et al.*, 2006).

O processo de desenvolvimento da tuberculose no organismo ocorre em duas fases. Na primeira fase forma-se o complexo primário, que consiste na lesão no local de entrada do agente e no linfonodo correspondente à região infetada. Denomina-se complexo primário completo caso a lesão abranja ambos os locais, e incompleto caso só se verifique lesão no linfonodo. A lesão da região de entrada é mais frequente quando a via de infecção é a inalação, não sendo tão frequente quando a via é a ingestão, observando-se lesões nos linfonodos mesentéricos e faríngeos, e menos comumente, úlceras intestinais (Radostits *et al.*, 2000; Neill *et al.*, 2001).

Passados sensivelmente oito dias após a entrada do agente, desenvolve-se um foco de lesão primário, que pode começar a calcificar passadas duas semanas. Esse foco primário é caracterizado por um granuloma que contém no interior uma necrose caseosa e delimitada por uma cápsula fibrótica, que provavelmente pode progredir para calcificação devido à destruição das regiões lesionadas e dos macrófagos infetados. A grande maioria das micobactérias presentes nesta massa acaba por não sobreviver, devido à acidez e baixa concentração de oxigénio (Radostits *et al.*, 2000; Cassidy, 2006). Caso exista infeção no tecido lesionado, a lesão pode alastrar, se surgir uma falha no sistema imunitário do animal (Whipple & Palmer, 2000).

A disseminação pós-primária geralmente tem uma apresentação miliar aguda, consistindo de lesões nodulares em vários órgãos, como é o caso dos pulmões e linfonodos, ou de tuberculose crónica, causada pela reinfeção endógena ou exógena de tecidos vulneráveis à tuberculoproteína, podendo esta situação não causar envolvimento do linfonodo local. Conforme o local onde está inserida a lesão, assim serão os sinais clínicos manifestados pelos animais. O estado geral característico desta doença, de magreza, toxémia, debilidade e eventual morte, devem-se ao facto de se tratar de uma doença progressiva (Radostits *et al.*, 2000).

1. 7 SINAIS CLÍNICOS

As micobactérias responsáveis pelas lesões, que muitas vezes estão inseridas nos tubérculos podem permanecer em estado latente durante vários anos, mas como não produzem toxinas, os animais acabam por não manifestar sinais clínicos (Goodchild & Clifton-Hadley, 2001). A maioria dos casos que ocorre em bovinos é diagnosticada após o teste da tuberculina ou no exame *post-mortem* (Coetzer & Tustin, 2004).

Ainda que os sinais clínicos por vezes não se encaminhem para um só diagnóstico, verificam-se casos de fraqueza, falta de apetite, dificuldade respiratória e episódios intermitentes de tosse seca e diarreia (DGAV, 2009).

Os bovinos que apresentam lesões de tuberculose miliar juntamente a um estado de emaciação progressivo, surgem uma forte suspeita de tuberculose. Sinais como alterações recorrentes de temperatura acompanhados, de falta de apetite, pelagem em mau estado e apatia são típicos desta doença. Estes sinais são mais notáveis após o parto ou em fases com quebras a nível nutricional (Radostits *et al.*, 2000).

Quando a infecção se propaga pelo pulmão e pelos respectivos linfonodos regionais surgem episódios de tosse crónica, em consequência da broncopneumonia. A tosse paroxística não é muito pronunciada, sendo esta geralmente baixa e produtiva, e caracterizada por um ou dois atos por episódio. Em situações em que a infecção é mais prolongada, com maior envolvimento da área pulmonar, o animal pode apresentar taquipneia. Nesta fase, já se conseguem identificar alterações a nível respiratório por intermédio de percussões e auscultações na zona torácica, como áreas de silêncio acompanhadas por áreas de crepitações e estertores, especialmente, nos lobos pulmonares caudais (Radostits *et al.*, 2000). A disseminação pelos linfonodos brônquicos culmina muitas vezes em dispneia, graças à constrição que provoca nas vias respiratórias, bem como os timpanismos ruminais recidivantes, que mais tarde se tornam persistentes pelo aumento dos linfonodos mediastínicos (Radostits *et al.*, 2000).

No que respeita ao aparelho intestinal, a diarreia consequente de úlceras intestinais é rara. Por ventura, é comum observar-se disfagia acompanhada de uma respiração ofegante e ruidosa, em consequência da hipertrofia do linfonodo retrofaríngeo que provoca obstrução da faringe e laringe. À palpação, ou em casos em que se recorra a endoscopia da faringe, é notável um aumento do tamanho e da consistência da faringe (Radostits *et al.*, 2000).

Em casos que afetem o aparelho reprodutor, pode verificar-se bursite, peritonite e salpingite, levando a uma hipertrofia dos ovários, com fluido de coloração amarela no seu interior. Em situações de metrite tuberculosa pode ocorrer infertilidade ou aborto no último terço de gestação. Em vacas em que há falha na concepção surge, muitas vezes corrimento purulento crónico, oferecendo elevada resistência ao tratamento. Em machos, os sinais mais comuns são hipertrofia e endurecimento testicular (Radostits *et al.*, 2000).

1. 8 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico da tuberculose é raro, sendo apenas perceptível em fases mais avançadas da doença. Situação ainda mais evidente surge nos animais silváticos, uma vez que não há qualquer tipo de manejo que lhes seja aplicado. Salvo exceções, como acontece na comercialização de animais silváticos para parques naturais, o diagnóstico nestas espécies é feito essencialmente *post mortem* (de Lisle *et al.*, 2002). Pode partir-se para um diagnóstico presuntivo com base nas lesões suspeitas observadas à necrópsia, mas só é efectuado

diagnóstico definitivo depois de ser efectuada a recolha da amostra onde está inserida a lesão, e depois de isolado e identificado o agente *M. bovis* por método de cultura (Llamazares, 1999).

Em Portugal, o diagnóstico da tuberculose em caça maior é realizado a partir de amostras de lesões suspeitas de tuberculose, recolhidas de animais abatidos em atividades cinegéticas, como é o caso das montarias. Estas amostras são enviadas para o Laboratório Nacional de Referência de Saúde Animal no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), onde são submetidas a exame histopatológico, e por último, pelo método Gold Standard que confirma o diagnóstico definitivo.

1. 9 DETECÇÃO DE LESÕES COMPATÍVEIS COM TUBERCULOSE

1. 9. 1 ACHADOS CLÍNICOS À LESÃO

1. 9. 1. 1 ACHADOS DE NECRÓPSIA

Os granulomas típicos desta doença, ainda que possam surgir em qualquer linfonodo, são mais característicos nos linfonodos retrofaríngeos, traqueobrônquicos e mediastínicos. Ao nível pulmonar pode haver uma disseminação por todo o órgão originando por vezes broncopneumonia supurativa enquanto na pleura e no peritoneu podem surgir granulomas tuberculosos. Os granulomas apresentados têm geralmente dimensões que variam entre 1 mm a 2 cm de diâmetro, e podem ou não confluir entre eles. Os granulomas apresentam uma coloração branca a amarelada, são envolvidos por uma cápsula fibrosa e contêm material caseoso espesso amarelado, cuja consistência varia podendo chegar a apresentar mineralizações que são compatíveis com o diagnóstico (Radostits *et al.*, 2000; Neill *et al.*, 2001).

Ainda que as lesões apresentem um padrão típico, é sem dúvida de salientar que possam surgir diferentes apresentações, conforme a espécie infetada. Em bovinos, lesões tuberculosas extensas com apresentação miliar são relativamente vulgares (Radostits *et al.*, 2000).

Em cervídeos tende a haver uma maior generalização da lesão sobre a região lesionada, e o conteúdo apresenta-se mais liquefeito (Figura 2) (Alfonso, 2007; Jesus, 2013).

Ainda em veados, a grande maioria das lesões localizam-se ao nível dos pulmões e dos linfonodos retrofaríngeos e linfonodos mesentéricos (Johnson *et al.*, 2008).

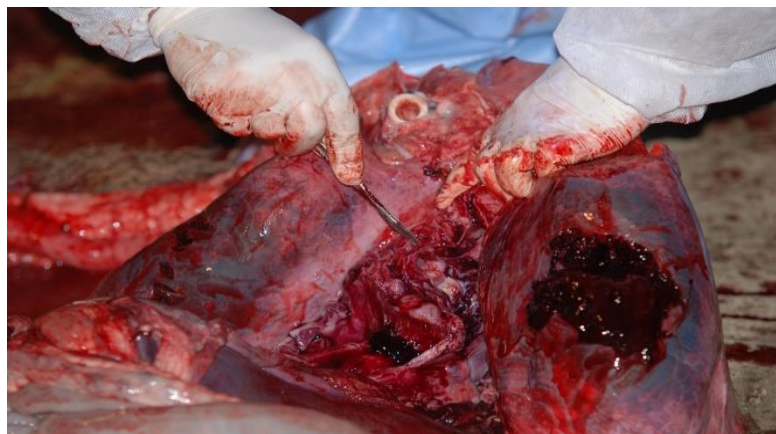


Figura 2 - Conteúdo purulento após incisão num linfonodo traqueo-brônquico de um veado (Fotografia do autor).

Nos javalis, uma vez que são animais mais gregários, ou seja, são vistos na sua grande maioria em grupo, existindo partilha de alimento logo uma maior probabilidade de transmissão, observando-se então com frequência lesões nos linfonodos submandibulares. Em conjunto, estes linfonodos drenam as mucosas bucais e nasais, laringe, faringe e amígdalas, pelo que poderão indicar uma exposição quer por via aerógena quer por via alimentar (Santos, 2007; Naranjo *et al.*, 2008).

Estas lesões podem levar a vários possíveis diagnósticos diferenciais, tais como, *Corynebacterium pyogenes*, *Actinomyces bovis*, *Actinobacillus lignieresii*, fungos, parasitoses e neoplasias (Cousins & Roberts, 2001).

1. 9. 1. 2. EXAME HISTOLÓGICO

Através de técnicas histopatológicas é possível observar características compatíveis com tuberculose, nomeadamente, lesões granulomatosas pela coloração de hematoxilina e eosina. Este exame é realizado com o intuito de pesquisar BAAR. O granuloma manifesta-se como um centro de necrose caseosa, que pode apresentar focos de calcificação ou calcificação completa, ao microscópico é possível que sejam identificáveis camadas concêntricas de macrófagos a envolver os focos de calcificação, células epitelióides, células gigantes multinucleadas de Langerhans, linfócitos e, eventualmente, a presença ou não de bacilos (Pollock *et al.*, 2006). Nas lâminas histológicas coradas por hematoxilina e eosina, os bacilos apresentam-se corados de cor vermelha, e o restante corte histológico de verde (Varello *et al.*, 2008). Embora este método seja simples, barato e como tal utilizado, apresenta algumas limitações, como é o caso da coloração ter também afinidade para os géneros *Nocardia*,

Rhodococcus e *Corynebacterium*, dificultando o diagnóstico final (Cousins, Roberts, 2001). Esta não é a técnica de eleição, uma vez que na maioria das lesões macroscópicas os BAAR não atingem concentrações mínimas para serem observados ao exame direto (Neves, 2011).

A coloração Ziehl-Neelsen (ZN) permite diferenciar microscopicamente os BAAR como é o caso das que pertencem ao género *Mycobacterium*, de outras bactérias não álcool-ácido resistentes (Miliam-Suazo, 2008). Os BAAR possuem mais de metade da constituição da sua parede celular composta por lípidos, ácidos micólicos característicos das bactérias do género *Mycobacterium*, motivo pelo qual se torna difícil a penetração dos corantes, bem como de outros produtos químicos uma vez que as paredes são hidrofóbicas. De seguida, e de modo a comprovar a resistência à descoloração pelo álcool-ácido aplica-se fucsina, um corante avermelhado que tem forte poder de ligação aos lípidos da membrana. Juntamente, procede-se à adição de ácido fénico submetendo-os ao calor de modo a facilitar a penetração através da parede lipídica, conferindo a coloração vermelha generalizada pelas células. Depois de aplicado o corante azul de metileno, as bactérias que não são álcool-ácido resistentes e outros elementos celulares coram de azul e os BAAR mantêm-se vermelhos (Pollock *et al.*, 2006; Varello *et al.*, 2008).

1. 9. 2 MÉTODO BACTERIOLÓGICO

1. 9. 2. 1 CULTURA

Tal como no exame histopatológico, também na cultura são recolhidas amostras de linfonodos e outros órgãos e tecidos lesados, para proceder a cultura microbiológica, e consequentemente, isolar e identificar o agente, com vista a obter um diagnóstico definitivo.

Esta é uma técnica que exige alguns cuidados, uma vez que são vários os fatores imprescindíveis para que a cultura culmine em sucesso, tais como: as condições de assepsia da colheita, a fim de evitar a contaminação dos tecidos com o solo e fezes que podem conter microorganismos que dificultarão o diagnóstico final; as condições de acondicionamento da amostra, que deve ser mantida entre 4 a 6°C, no máximo durante 24 a 48 horas após a colheita, ou, caso de não ser possível, deve ser mantida congelada até ao processamento de cultura (Corner, 1994). Todos os procedimentos de cultura devem ser processados de acordo com as normas standardizadas e impostas pelo regulamento da OIE (OIE, 2009).

As micobactérias são altamente exigentes no que se refere a nutrientes quando comparadas com outras bactérias patogénicas. Essas características facilitam a multiplicação

de microrganismos menos exigentes, que podem competir com *M. bovis* e prejudicar o seu crescimento, o que torna indispensável a descontaminação das amostras previamente à tentativa de isolamento. A descontaminação pode ser feita pela utilização de detergentes (cloreto de hexadecilpiridínio), bases (hidróxido de sódio a 2-4%) ou ácidos (ácido oxálico 5%) (Donaghy *et al.*, 2008; OIE, 2009).

Os meios mais utilizados para a cultura de *M. bovis* são os sólidos à base de ovo, principalmente o meio de Stonebrink com piruvato ou piruvato e glicerol, ou agar enriquecido com soro ou sangue (Corner, 1994).

As culturas de *M. bovis* devem ser incubadas a 37°C na presença ou não de dióxido de carbono, por um período mínimo de 8 a 12 semanas, ainda que o desenvolvimento desta micobactéria ocorra notavelmente, entre as 3 e as 6 semanas consoante o meio em cultura (OIE, 2009).

1. 9. 3 MÉTODOS MOLECULARES

Tanto os métodos bacteriológicos como os métodos moleculares desempenham a tarefa de identificar o agente a partir do seu isolamento, proporcionando um encurtamento do tempo necessário para a sua identificação, quer a partir de culturas quer a partir de amostras (técnicas de amplificação dos ácidos nucleicos) (Coolins, 2011). Diferentes técnicas foram desenvolvidas no âmbito de tornar o estudo das sequências de DNA mais eficiente. Foi o caso da técnica de PCR, bem como da análise de polimorfismos de tamanhos de fragmentos de restrições de DNA (RFLP).

Uma vez que a epidemiologia da doença nos bovinos tem implicações no programa de erradicação da tuberculose, este meio de diagnóstico pode ser determinante dado que pode fornecer detalhes sobre a direcção de transmissão de *M. bovis* e do seu potencial de disseminação entre animais de produção e animais silváticos (Cunha *et al.*, 2011).

1. 10 FATORES DE RISCO

1. 10. 1 FATORES DE RISCO INTRÍNSECOS

Quanto ao sexo do animal, ainda que não seja um fator totalmente clarificado, verifica-se um maior número de casos em fêmeas. Poderá estar associado aos fatores comportamentais intrínsecos do género feminino, à fase de aleitamento e à reprodução (Humblet *et al.*, 2009).

Uma vez que o período de exposição ao agente aumenta com a idade, a tuberculose é mais comum em animais adultos. Contudo, é de mencionar que os animais podem ficar infetados numa idade mais jovem e só mais tarde manifestar clinicamente a doença, em virtude de um período de incubação longo (Humblet *et al.*, 2009).

Ainda relacionado com o hospedeiro, há situações que alteram o seu sistema imunitário, diminuindo a sua resistência a certos agentes, e consequentemente, torna-o mais suscetível a contrair a infeção. Fatores como stress, má condição corporal, desequilíbrios nutricionais, coexistência de outras doenças e gestação, são apontados como condições que aumentam a predisposição para contrair a infeção (Pollock *et al.*, 2001; Abalos & Retarnal, 2004).

A raça dos animais poderá ser um fator de risco. Num estudo realizado numa região do sul de África verificou-se que a prevalência da infeção era superior no gado leiteiro importado da Etiópia, relativamente às raças autóctones, por exemplo a raça zebu. Contudo, uma vez que são animais criados em ambientes intensivos, existindo um maior confinamento e, um aumento do contato entre os animais, logo um aumento acrescido do risco de transmissão (Humblet *et al.*, 2009).

1. 10. 2 FATORES DE RISCO EXTRÍNSECOS

Os fatores de risco extrínsecos ou seja, não relacionados diretamente com o hospedeiro, têm um maior peso na predisposição à doença, sendo exemplos as situações em que há sobrepopulação ou um maior confinamento, como ocorre muitas vezes nos animais de produção, em que há consequentemente contato com estrume, urina e secreções dos restantes animais. O mesmo acontece em casos em que há uma partilha do mesmo espaço, pontos de alimentação entre animais de produção e os animais silváticos (Figura 3). A maior proximidade entre animais leva a que se houver um ou mais animais infetados o risco de disseminação da doença seja superior (Goodchild & Clifton-Hadley, 2001).

Em certas explorações reúnem-se uma série de fatores de risco que comprometem a saúde do efetivo. São exemplos: a existência de rebanhos de grandes dimensões e cujos animais estejam localizados em áreas muito vastas; animais que não estão habituados a ser manuseados; a existência de reservatórios silváticos de *M. bovis*; ou de cabras que são suscetíveis de serem infetadas, e o porco ibérico que são animais que não são sujeitos a nenhum programa de erradicação (Gordejo & Vermeersch, 2006).



Figura 3 - Exemplos de vedações para delimitar as explorações pecuárias (Fotografia do autor).

Legenda:

A: Vedação imprópria ao impedimento de passagem de animais silváticos numa exploração.

B: Rede apropriada e em boas condições para evitar a passagem de javalis e veados.

No Centro e no Sul do País, onde um grande número de bovinos é criado em regime extensivo, por vezes surgem épocas do ano caracterizadas por carências alimentares e deficientes condições de abeberamento. Os animais concentram-se em pontos de alimentação suplementar e bebem de fontes de água estagnada ou de curso lento, levando a que se reúnam as condições favoráveis à disseminação da doença (Griffin, 1996; DGAV, 2010).

Outro fator de risco sucede após as inspeções sanitárias das atividades de caça maior, quando as vísceras e tecidos resultantes desta inspeção sanitária não são devidamente eliminados, dentro das condições higio-sanitárias impostas pela DGAV. A não eliminação destes subprodutos permite que os microrganismos permaneçam no ambiente, uma vez que o

bacilo *M. bovis* pode permanecer viável durante meses (Gortazar, 2003; Fonseca, 2011). Sendo que alguns os cadáveres e subprodutos de animais infetados deixados no ambiente, em vez de enterrados, e que acabam por ser consumidos na grande maioria por outros animais, ficando estes infetados, embora possam também ficar infetados apenas pela exposição ambiental ao agente (Neves, 2011).

O aumento generalizado de densidade da população de javalis e veados, quer devido à falta de predadores naturais como de boas práticas na gestão cinegética, poderá facilitar o contato entre animais silváticos infetados e bovinos, com consequente aumento da transmissão do agente aos animais de produção criados em extensivo (de Mendoza *et al.*, 2006).

1. 11 SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

1. 11. 1 EPIDEMIOLOGIA MUNDIAL

A tuberculose bovina tem distribuição a nível mundial, variando a sua prevalência conforme o local geográfico (Jesus, 2013). Nos países em desenvolvimento não existe muita informação sobre a prevalência, dado que as medidas de controlo são na sua grande maioria ineficazes (Jesus, 2013). Segundo Cosivi *et. al.*, (1998), na década de 90, apenas um terço dos países que reportavam a doença tinham programas para a sua erradicação. Situação idêntica foi descrita na Ásia estimando-se que 94% do gado bovino e 99% dos búfalos viviam sem programas de erradicação ou estes eram praticamente inexistentes (Cosivi *et al.*, 1998). Na América Central e do Sul, cerca de 70% do efetivo bovino (de 375 milhões) localizam-se em áreas geográficas onde as taxas de prevalência de infeção de tuberculose bovina é igual ou superior a 1%. A Argentina e o Brasil são exemplos disso, supondo-se que existam 3,5 milhões de animais infetados embora se tenham vindo a adotar medidas de controlo (Cosivi *et al.*, 1998; de Kantor & Ritacco, 2006).

Contrariamente, nos países desenvolvidos a tuberculose em animais é rara, podendo haver alguns surtos em efetivos pequenos, ainda que muito esporadicamente. A doença é diagnosticada mais tardiamente nos matadouros, nos quais é feita uma avaliação da carcaça da responsabilidade do médico veterinário, seguindo-se em caso de suspeita o isolamento e identificação do agente em laboratório (Rabdostits *et al.*, 2000).

Na União Europeia, e de acordo com a legislação em vigor, um Estado Membro ou região é considerado oficialmente indemne de tuberculose bovina quando os seguintes requisitos são cumpridos: cada bovino está identificado e registado de acordo com a legislação

comunitária; todos os bovinos abatidos são sujeitos a uma avaliação *post mortem* oficial; a percentagem anual de efetivos confirmados como infetados não excede 0,1% durante seis anos consecutivos e pelo menos 99,9% dos efetivos têm o estatuto de oficialmente indemnes de tuberculose no final de cada ano, também durante um período de seis anos (Gordejo & Veermesch, 2006; EFSA, 2015).

Os Estados Membros ou regiões declaradas oficialmente indemnes de tuberculose pela Comissão Europeia em 2013 eram: Alemanha, Áustria, Bélgica, Dinamarca, Eslováquia, Estónia, Finlândia, França, Holanda, Letónia, Luxemburgo, Noruega, Polónia, República Checa, Suécia e Suíça, a região do Algarve em Portugal e algumas regiões e/ou províncias italianas, e escocesas (Decisão 2012/204 / EU29) (EFSA, 2015).

No entanto, nos países oficialmente indemnes, ainda surgem casos numa forma pouco significativa. Assim, de entre os 16 Estados Membros oficialmente indemnes, cinco apresentaram explorações de bovinos infetadas (Alemanha, Bélgica, França, Holanda e Polónia). Nas regiões oficialmente indemnes da União Europeia, a proporção de efetivos infetados com *M. bovis* foi de 0,015% em 2013 à semelhança do ano de 2012 (EFSA, 2015).

Nos países não oficialmente indemnes, verifica-se uma relativa tendência na diminuição das explorações infetadas em relação aos anos anteriores. (EFSA, 2015).

A título de curiosidade, no ano de 2013 foram relatados em dezasseis Estados Membros e dois não inseridos nos Estados Membros 903 casos de animais infetados com *M. bovis*; para além dos casos identificados em bovinos, alguns foram reportados em espécies silváticas (EFSA, 2015).

1. 11. 2 SITUAÇÃO NA PENÍNSULA IBÉRICA

Os primeiros estudos sobre tuberculose em espécies silváticas na Península Ibérica foram realizados em Espanha. Vários foram os estudos que identificaram o veado (*Cervus elaphus*) e o javali (*Sus scrofa*) como importantes reservatórios desta doença, chegando a verificar-se casos em populações geograficamente dispersas entre si e apresentando prevalências de tuberculose elevadas (Parra *et al.*, 2004; de Mendoza *et al.*, 2006).

Em Espanha é de ter em consideração que em certas regiões próximas da fronteira com Portugal existem características ecológicas muito parecidas, bem como a partir da fauna silvestre existente. Contudo, é de todo pertinente ter conhecimento acerca desta doença na fauna silvestre, uma vez que o conhecimento do papel dos hospedeiros silváticos como reservatórios

e disseminadores de *M. bovis* determinante para o êxito na erradicação da doença (Santos, 2006; Santos *et al.*, 2010).

Em Portugal, os valores de prevalência da tuberculose em bovinos e a ocorrência de casos da doença em javalis estão consideravelmente associados (Santos, 2006). Segundo este autor, a presença de tuberculose em javalis está associada com a densidade e diversidade de ungulados silváticos. Contudo, é cada vez mais evidente a transmissão de *M. bovis* entre bovinos e veados ou javalis (Duarte, 2007).

1. 11. 3 EPIDEMIOLOGIA NACIONAL

Portugal apresentou à União Europeia, em 1992, um programa trienal de erradicação da tuberculose bovina com *términus* em 1995 tendo vindo a ser aprovado pela Decisão da Comissão 92/299/CEE (DGAV, 2015).

Em Portugal houve uma melhoria da prevalência de tuberculose bovina desde o ano 2000, atingindo em 2008 o seu valor mais baixo. Em 2009 a situação inverteu-se e a prevalência aumentou. Esta situação teve particular relevo na região do Alentejo, em algumas áreas da região Centro e Norte, tendo como suporte não só a deteção da doença em vida na exploração como no matadouro. Esta eficácia na deteção foi em parte devida ao fluxo de informação levado a cabo pela reorganização dos serviços veterinários, que se veio a revelar uma ferramenta indispensável para a confirmação das estratégias implementadas e da deteção em exploração. Não é então de estranhar o agravamento dos indicadores epidemiológicos dado que houve um decréscimo das explorações existentes em Portugal, associado a um aumento do número de animais existentes. Esta situação fez com que houvesse uma maior concentração de animais, e consequentemente, a disseminação da infeção (DGAV, 2015).

A aliar a todos estes fatores, a valorização das atividades em prole da caça maior tem gerado um aumento da densidade populacional daquelas espécies (DGAV, 2015).

Na medida da erradicação da doença têm sido exigidos outros parâmetros desde 2009, tais como:

- 1) Melhoria das performances de deteção na exploração através do acompanhamento e controlo da execução da prova de intradermotuberculinização comparada (IDTC) e da formação e reciclagem dos executores;
- 2) Aumento do número de animais testados em vida, nas zonas de risco;
- 3) Acompanhamento do cumprimento dos prazos de reinspecção dos efetivos infetados;
- 4) Revisão e uniformização das regras de aplicação dos testes de pré-movimentação;
- 5) Monitorização e vigilância das espécies de caça maior abatidas (DGAV, 2015).

Os estudos epidemiológicos realizados no gado bovino em 2010 revelaram como principais fatores de risco a introdução de novos animais na exploração (26%), o contacto com espécies silváticas (19%), o contacto direto com outras explorações (15%) e a recorrência de infeção em explorações previamente afetadas (7%) (Fonseca, 2011).

1. 11. 4 PLANO NACIONAL DE ERRADICAÇÃO DA TUBERCULOSE BOVINA

Em Portugal, com base na aplicação de rigorosos programas de erradicação desde há vários anos, tem-se assistido a uma melhoria dos estatutos sanitários. De acordo com o Decreto-Lei nº 272/2000 são estipuladas as normas de execução do plano de erradicação (PE) da tuberculose bovina (TB), a classificação das explorações nos diferentes estatutos sanitários, bem como nas regiões autónomas (DGAV, 2015).

Tudo o que está relacionado com a elaboração de tarefas, coordenação, controlo da execução e auditorias do PE é da responsabilidade da DGAV. São as Organizações de Produtores Pecuários (OPP), existentes em várias regiões do país, que enviam à DGAV para aprovação do plano sanitário a executar pelo médico veterinário da OPP a que corresponde a exploração, no entanto cada criador é livre de escolher o médico veterinário responsável pela realização das ações de rastreio e sanidade na sua exploração (DGAV, 2015).

Os efetivos são classificados em estatuto T2, efetivo não oficialmente indemne, que pode passar para T2.1 caso no mesmo efetivo já tenham surgido casos positivos, e T3, efetivo oficialmente indemne, que pode passar à classificação de T3S, sempre que o estatuto T3 é suspenso. No anexo 1, é possível observar as condições para as alterações de estatuto sanitário dos efetivos (DGAV, 2015). Em Portugal, como meio de diagnóstico em bovinos utiliza-se a IDTC, com recurso às tuberculinas bovina e aviária que é obtida de uma estirpe de *M. avium* subsp. *avium*. A prova de IDTC pode ser complementada com o teste do IFN- γ , quantificado a partir do teste Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Esta prova consiste na inoculação de 0,1 ml de cada um dos tipos de tuberculina na tábua do pescoço. A inoculação da tuberculina bovina deve ser situada, sensivelmente, 12 cm abaixo da tuberculina aviária. Toda esta ação é antecedida de tricotomia nos locais onde se vão efetuar as inoculações, seguida da medição da espessura da pele nesses locais. Passadas 72 horas (+/- 4 horas) após a inoculação volta-se a medir espessura da pele.



Figura 4 - Ação de tuberculinização a um efetivo bovino (Fotografia do autor).

O resultado é considerado positivo sempre que o aumento da espessura da prega de pele no local de administração da tuberculina bovina é igual ou superior a 4 mm, relativamente ao aumento produzido no local da inoculação da tuberculina aviária. Geralmente, o aumento da espessura da prega de pele acompanha-se de outros sinais clínicos, tais como: edema difuso, exsudado, necrose, dor ou reação inflamatória. Os animais cuja medida da espessura de pele apresente resultado que seja positivo, serão então sujeitos ao abate sanitário no máximo até 30 dias após a data de notificação oficial do proprietário. Ainda e segundo o Decreto-Lei nº272/2000, o proprietário perderá o direito a qualquer indemnização por abate sanitário por um período de dois anos sempre que se comprove a partir do inquérito epidemiológico que o aparecimento da doença foi verificado em animais reintroduzidos no rebanho. O animal é considerado com um resultado duvidoso caso não se observem nenhum dos sinais referidos na reação positiva, mas o aumento da espessura da pele for superior a 2 mm e inferior a 4 mm; caso se observe apenas um inchaço limitado, com um aumento máximo de 2 mm de espessura da prega da pele, sem os sinais clínicos acima referidos, é considerado como resultado negativo (DGAV, 2005).

Interpretação de Resultados da IDTC			
$\Delta B - \Delta A$ (mm)		Sinais Clínicos	Interpretação
$\Delta B < 2$	--	Ausentes	Negativo
$\Delta B < \Delta A$	< 0	Ausentes	Negativo
$\Delta B > \Delta A$	1 a 4	Ausentes	Duvidoso
$\Delta B > \Delta A$	> 4	Presentes (e/ou)	Positivo

Figura 5 - Interpretação dos resultados à reação da prova da tuberculina aviária AA (*M. avium*) em comparação com as medidas da reação à prova da tuberculina mamífera AB (*M. bovis*) (DGAV, 2005).

Associados a esta prova, podem surgir resultados falsos positivos muitas vezes em função de sensibilidade a outros agentes infecciosos/inflamatórios. A imunossupressão, devida muitas vezes a situações de stress que tanto podem ocorrer no pós-parto, como num animal em que lhe tenham sido administrados fármacos imunossupressores, pode levar à indução destes falsos positivos referidos (Radostits, *et al.*, 2000).

Sempre que numa exploração surja um animal suspeito ou positivo, a exploração é sujeita ao abate sanitário dos animais positivos com a respetiva colheita e envio das amostras para laboratório, é realizado um inquérito epidemiológico, sequestro e desinfecção dos estábulos e anexos que estiveram em contacto com os animais (DGAV, 2015).

1. 12 TUBERCULOSE EM ESPÉCIES SILVÁTICAS

1. 12. 1 INTERAÇÃO DE *Mycobacterium bovis*- ESPÉCIES SILVÁTICAS

O controlo da tuberculose em animais silváticos é, sem dúvida, uma situação de difícil controlo tendo em conta o seu comportamento, bem como o modo de vida livre (Bourne, 2007).

Em Portugal, é cada vez mais evidente o papel determinante que os hospedeiros silváticos têm na epidemiologia da doença. Desta forma a identificação das espécies que atuam como reservatórios de *M. bovis* é crucial, e em seguida, é importante definir a localização geográfica da doença nessas populações. Só deste modo será possível intervir com a imposição de medidas de controlo sobre os animais silváticos.

Várias são as medidas que em algumas explorações se têm posto em prática e modo a evitar o contacto entre as espécies domésticas e silváticas. No que diz respeito à comunicação nos espaços em comum, como pradarias, a construção de comedouros e bebedouros artificiais ou o recurso ao uso de vedações em número suficiente e proporcional à sua necessária dispersão, são algumas das medidas que devem ser implementadas (AFN & DGAV, 2010). O estado de saúde da fauna cinegética deve ser comunicado à DGAV, com recurso a recolha de amostras, sendo uma das medidas de controlo em animais silváticos. Também o controlo de densidade de animais silváticos é vantajoso, bem como o conhecimento e estado de saúde da população, tanto a doméstica como a silvestre (AFN & DGAV, 2010). O desenvolvimento de uma vacina eficaz poderia ser uma boa medida na prevenção da doença, mas para tal será necessário obter dados epidemiológicos que o justifiquem (de Lisle *et al.*, 2002).

A possibilidade de animais silváticos estarem infetados por *M. bovis* e constituírem reservatórios da doença responsáveis pela reintrodução da doença em explorações livres de tuberculose, tem sido uma questão muito debatida recentemente. No entanto, em Portugal, o apoio dos dados moleculares que forneçam informação sobre as estirpes isoladas (Figura 6). Apenas as informações recolhidas em inquéritos epidemiológicos oficiais, que meramente, testemunham a potencial transmissão entre espécies silváticas e domésticas (Duarte, 2007).



Figura 6 - Análise dos padrões de spoligotyping, em que é possível verificar a partilha destes entre animais de produção e silváticos (adaptado de Duarte, 2008).

Sabe-se que o bacilo *M. bovis* afeta diversas populações de animais silváticos sendo considerada uma doença emergente na fauna selvagem, possivelmente por fatores antropogénicos (Dobson & Foufopoulos, 2001). Têm sido detetados casos de infeção tanto em animais silváticos de vida livre como em cativeiro, o que é de todo preocupante, pois são uma fonte de infeção não só para os animais domésticos como para os humanos (Thoen *et al.*, 2009). Nos últimos 10 anos, cerca de 22% dos países membros da OIE relataram a ocorrência de tuberculose na fauna selvagem. Este número poderá ficar aquém da realidade, uma vez que sendo animais de fauna silvática, logo de distribuição aleatória pelo território, o leva a que o controlo da doença nestas populações se torne uma tarefa difícil (Whipple & Palmer, 2000). Este obstáculo tem sido particularmente contornado em países desenvolvidos, como é o caso dos Estados Unidos da América e Canadá, pela captura de cervídeos para recolha de sangue e posterior libertação com colocação do emissor de rádio. Após teste sorológico e caso o resultado seja positivo ou suspeito, o animal é localizado e de seguida abatido. A juntar ao facto de um difícil controlo do número de animais silváticos existentes em determinadas regiões, ainda mais complicado é a deteção de sinais clínicos nestes animais (Whipple & Palmer, 2000; Corner 2006; Palmer & Waters, 2006). No entanto França que tem uma rede de vigilância epidemiológica ativa há várias décadas, apenas identificou casos em espécies silváticas após a erradicação em bovinos. A identificação da doença é então dificultada pela diferente apresentação das lesões que cada espécie apresenta (Bengis *et al.*, 2002).

Estes motivos evidenciam a dificuldade em fazer um controlo rigoroso da tuberculose na fauna silvática. Muitas vezes as associações de caçadores acabam por não realizar desbastes

ou até mesmo caçadas, o que faz com que seja mais difícil fazer um controlo da densidade das espécies. Como resultado, situações já referidas como a sobrepopulação vão fazer com que haja uma maior partilha dos pontos de abeberamento e alimentação entre os animais de produção e os animais silváticos, saudáveis e infetados, situação esta ainda mais evidente em alturas de carências alimentares. Ao fim e ao cabo o que se pretende das entidades gestoras de caça é não só que se controle/reduza o número de animais silváticos, como se reforcem e diversifiquem os pontos de abeberamento e alimentação para evitar a coabitação entre os diversos animais (Fonseca, 2011; DGAV, 2011a).

1. 12. 2 INSPEÇÃO SANITÁRIA EM ESPÉCIES DE CAÇA MAIOR

Todas as reses de caça maior que se destinam a ser comercializadas provenientes de atividades cinegéticas declaradas à DGAV, são sujeitas ao exame inicial realizado pelo médico veterinário, selecionado pela entidade gestora de caça. Depois as reses que não foram rejeitadas pelo médico veterinário seguem para um centro de preparação das reses (de animais) de caça. A entidade gestora tem até 48 horas antes da realização da atividade cinegética para comunicar à DGAV a identificação do “médico veterinário designado” (Fonseca, 2011).

Relativamente, ao exame inicial em si (*post mortem*), este deve ser realizado logo que possível após o abate animal. As condições para uma correta inspeção passam pela necessidade de avaliação num local limpo, com água potável, iluminação adequada e restrito ao acesso de pessoas sem responsabilidade pela evisceração e realização do exame inicial. Estes locais devem ainda dispor de contentores para colocação de subprodutos, equipamentos para suspender as carcaças, e devem ser concebidas de modo a evitar a acumulação de líquidos no solo (AFN & DGAV, 2010).

O exame inicial incide em órgãos onde seja provável encontrar lesões compatíveis com tuberculose (LCT) como o pulmão, o fígado e alguns linfonodos, caso o médico veterinário suspeite de animais infetados por tuberculose há uma rejeição total das reses suspeitas (DGAV, 2010). Em seguida, as amostras têm que ser recolhidas e identificadas, colocadas em contentores estanques e identificados com o número do selo correspondente. Após a recolha, as amostras são mantidas em zonas de refrigeração ou congelação, e é feito o preenchimento da requisição de análises (mod 949/dgv) com posterior envio via CTT em caixa isotérmica para o INIAV para confirmação do diagnóstico presuntivo (AFN & DGAV, 2010; DGAV, 2011c).

O exame inicial não substitui a inspeção sanitária das reses de caça maior. Desta forma, de acordo com o Regulamento (CE) nº 853/2004, a colocação no mercado destes exemplares de caça com vista ao consumo humano (excluindo o autoconsumo e a cedência ou partilha de carne por parte dos próprios caçadores) obriga ao seu encaminhamento, depois de realizado o exame inicial, para um centro de preparação de caça aprovado pela DGAV ou matadouro licenciado. Deste modo, a comercialização de carne de caça maior só é possível depois de lhe ser aposta a respetiva marca de salubridade (AFN & DGAV, 2010; ASAE, 2010).

Todos os subprodutos dos animais abatidos, sem lesões, devem ser encaminhados para uma unidade de tratamento de subprodutos licenciados. Por sua vez, as vísceras e carcaças de animais suspeitos de doenças transmissíveis ao homem, ou com características anormais é aconselhável que sejam enterrados convenientemente (AFN & DGAV, 2010). O enterro das carcaças e subprodutos não aptos para consumo devem seguir as seguintes normas:

- Deverá ser feita uma vala para serem enterrados os subprodutos;
- Os subprodutos durante a evisceração devem ser acondicionados para não haver contaminação durante o transporte;
- O enterro deve evitar a contaminação de lençóis friáticos e ser feito a uma profundidade suficiente para que outros animais não lhes consigam aceder;
- Sobre eles deve ser-lhes aplicado um desinfetante e depois cobertos por uma camada de terra com cerca de um metro de espessura (AFN & DGAV, 2010).

2. OBJETIVOS

O presente estudo visa contribuir para um melhor conhecimento da epidemiologia da tuberculose bovina, causada pelo *Mycobacterium bovis* em animais de caça maior e em gado bovino, nos concelhos de Moura e Barrancos. Estes dois concelhos encontram-se inseridos em área epidemiológica de risco para a tuberculose, e onde nos últimos anos têm surgido casos de tuberculose bovina. Um dos obstáculos ao controlo desta doença no gado bovino surge na incerteza da origem da sua infeção, embora seja, como já referido, apoiada na ideia de que possa ser proveniente nos animais silváticos. Ambas as áreas de estudo são significativamente habitadas por javalis e veados, motivo pelo qual juntamente com o gado bovino, foram escolhidos como espécies-alvo neste estudo.

Desta forma, os objetivos específicos deste trabalho foram os seguintes:

- a) Identificação das explorações de bovinos saneadas nos concelhos de Moura e Barrancos;
- b) Caracterização das diferentes explorações, tendo em conta a dimensão do efetivo e a presença ou não, de caprinos e/ou ovinos e a positividade à infeção pelo *M. bovis*;
- c) Recolha de amostras de reses de caça maior (veados e javalis) e consequente confirmação de diagnóstico ou não de infeção por *M. bovis*;
- d) Avaliar uma possível relação epidemiológica entre os casos de tuberculose confirmados em bovinos e em animais silváticos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CASOS DE TUBERCULOSE EM BOVINOS E EM ESPÉCIES DE CAÇA MAIOR

3. 1.1 ATIVIDADE I- FOCOS DE TUBERCULOSE NO NÚCLEO DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA DE SERPA

3. 1. 1. 1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO EM ESTUDO

Os dois concelhos a partir dos quais se realizou o estudo têm efetivos de bovinos de carne, em regime extensivo e são na generalidade explorações de grandes dimensões, com valores de encabeçamento de um animal por hectare. A partir dos dados gentilmente fornecidos pelo Agrupamento de Defesa Sanitária (ADS) de Moura e Barrancos, foram saneados 20 378 bovinos repartidos entre 195 explorações. A maioria das explorações tem entre 100 a 249 bovinos. No concelho de Moura existem 155 explorações e no concelho de Barrancos 40. As condições meteorológicas e geográficas destes concelhos são semelhantes. O concelho de Barrancos faz fronteira com Espanha e estas são regiões intensamente habitadas por animais silváticos (Figura 7) caracterizadas por relevo mais acentuado, e pela presença significativa de bosques e florestas.

Todas as explorações destes concelhos são compostas por animais resultantes do cruzamento de raças autóctones (alentejana e mertolenga) e exóticas (charolesa e limousine), sendo a única finalidade a produção de vitelos (constituídas por vacas aleitantes, efetivos de substituição e vitelos em desmame). Todas as explorações estudadas apresentam um sistema extensivo de produção.

De modo a manter a confidencialidade a marca das explorações serão mantidas em anonimato.



Figura 7 - Javalis e bovinos numa área comum (Fotografia do autor).

3. 2 SANEAMENTO DE GADO BOVINO NOS CONCELHOS DE MOURA E BARRANCOS E CARACTERIZAÇÃO DAS EXPLORAÇÕES COM FOCOS DE TUBERCULOSE

As explorações de bovinos foram agrupadas de acordo com o número de bovinos existentes, em cinco categorias: menos de 50, entre 50 e 99 animais, entre 100 e 249 animais, entre 250 e 499 animais e, 500 ou mais (Gráfico 1). Seguidamente, procedeu-se à localização de cada uma das explorações identificadas através do programa, Google Earth, de modo a verificar se existe relativa proximidade entre as explorações confirmadas com casos de tuberculose. Com este programa foi possível visualizar as coordenadas geográficas.

São consideradas explorações positivas à tuberculose, aquelas que apresentaram pelo menos um bovino positivo à prova de IDTC durante o período em estudo, independentemente do número de vezes que o efetivo tenha sido controlado. Sendo a tuberculose uma doença de declaração obrigatória, todos os resultados positivos são comunicados obrigatoriamente pelos médicos veterinários à DGAV.

Foram registados os casos de animais positivos ao isolamento observação de lesões características de tuberculose nos exames histopatológicos, e isolamento do agente pelo método de cultura.

Seguidamente procedeu-se à localização das explorações em que foram confirmados casos de infeção.

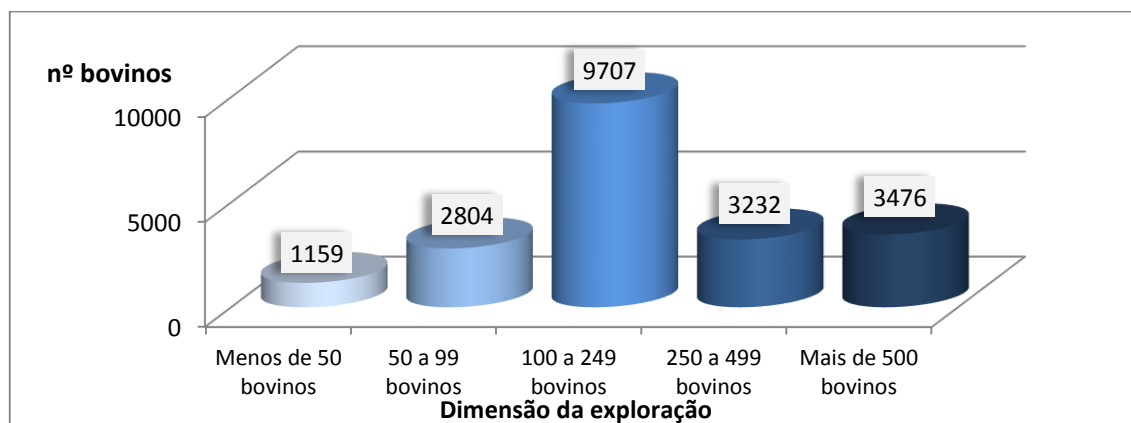


Gráfico 1 - Distribuição do número de bovinos saneados por dimensão da exploração (N=20378)

Pela leitura do gráfico 1, verifica-se que dos 20.378 bovinos rastreados, a maior parte do efetivo encontra-se em explorações cuja dimensão é de 100 a 249 bovinos, totalizando 9.707 bovinos. Apenas 1. 159 animais estão distribuídos em explorações com menos de 50 bovinos;

2804 bovinos nas explorações de 50 a 99 bovinos e 3476 nas explorações de mais de 500 bovinos.

3.3. ATIVIDADE II - ACOMPANHAMENTO DAS SEIS MONTARIAS

3.3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ZONAS DE CAÇA

Em Portugal, existem diferentes tipos de zonas de caça, que podem ser associativas, turísticas, nacionais ou municipais, de acordo com o Decreto-Lei nº 202/2004, estando a cargo das suas entidades gestoras a elaboração de planos de ordenamento, bem como a sua exploração cinegética. Nos dois concelhos onde se realizou este estudo, Moura e Barrancos, correspondentes a áreas epidemiológicas de risco de tuberculose (Figura 8), predominam as zonas de caça turísticas, de onde se pode tirar partido de alguma rentabilidade económica, dado o seu potencial cinegético. Todas as montarias que contribuíram para este estudo foram realizadas em áreas não limitadas por vedações, de forma que os animais podiam circular livremente entre outras propriedades vizinhas (Figura 9). De salientar, que em todas estas áreas estão inseridas algumas explorações de bovinos.

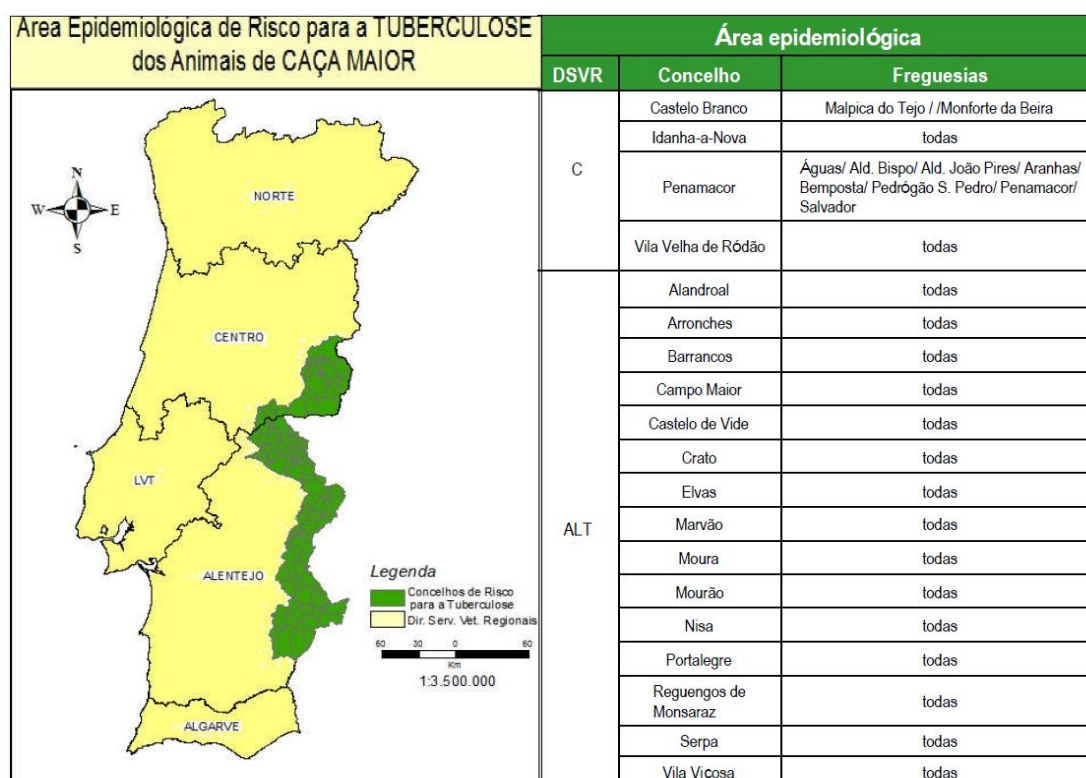


Figura 8 - Esquema demonstrativo das áreas epidemiológicas de risco para a tuberculose dos animais de caça maior em Portugal (adaptado de DGAV, 2011b).

Estes dois concelhos são característicos pela intensa atividade cinegética, essencialmente caçadas de montaria, pois são concelhos que reúnem características adequadas, tais como o clima, o solo, a alimentação e vegetação, ao desenvolvimento de espécies cinegéticas de caça maior, predominantemente, javalis e veados.

Deste estudo foram inspecionadas e recolhidas amostras de seis montarias realizadas, três no concelho de Barrancos, e três no concelho de Moura, das quais foram caçados 248 animais (191 veados e 57 javalis).

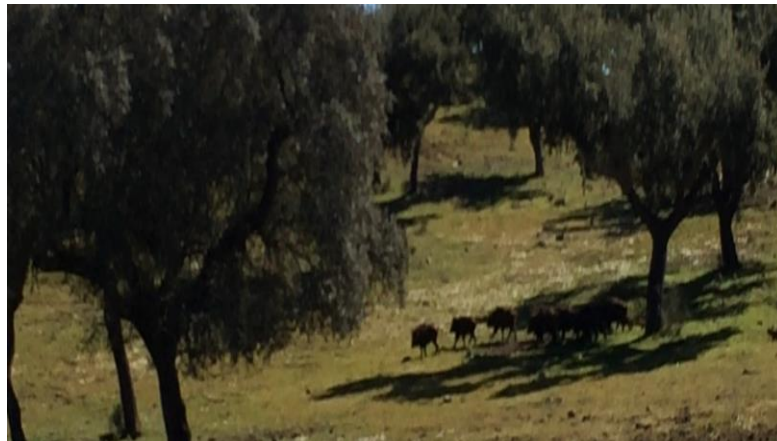


Figura 9 - Javalis em fuga durante uma caçada (Fotografia do autor).

3. 3. 2 INSPEÇÃO SANITÁRIA DE CAÇA MAIOR EM MONTARIAS REALIZADAS NOS CONCELHOS DE MOURA E BARRANCOS

Nas seis montarias realizadas, que serviram como objeto de estudo, as reses (javalis e veados) foram recolhidas do próprio local onde foram abatidas por pessoas que integravam a entidade organizadora da montaria e levadas até à zona onde se procedeu à respetiva inspeção sanitária (Figura 10) e onde o pessoal responsável pela desmancha procedeu à evisceração e ao corte da cabeça e patas.



Figura 10 - Reses abatidas no final da montaria aptas a serem inspecionadas pelo médico veterinário designado (Fotografia do autor).

Também para a localização de cada uma das montarias se recorreu ao programa, Google Earth.

No que respeita à inspeção sanitária (Figura 11), mais concretamente a recolha de amostras executadas pelo médico veterinário responsável, utilizou-se o seguinte material: facas, bisturi, pinça de disseção com dentes e recipiente com água e iodopovidona para desinfetar o material entre reses. De referir, que todos estes procedimentos se realizaram com vestuário de proteção apropriado e luvas de látex e/ou nitrilo, pois a doença em pesquisa tem caráter zoonótico.



Figura 11 - Evisceração de um veado (Fotografia do autor).

3. 3. 2. 1 INSPEÇÃO MACROSCÓPICA

Foi efetuada uma inspeção macroscópica às carcaças e vísceras torácicas e abdominais de todos os animais abatidos, em busca de lesões compatíveis com tuberculose (LCT). Segundo a distribuição característica destas lesões, foi dada especial atenção à pesquisa nos pulmões e linfonodos submandibulares e retrofaríngeos em javalis, e linfonodos traqueo-brônquicos e mesentéricos e também pulmões em veados, procedendo-se à realização de vários cortes em cada um destes órgãos.

3. 3. 2. 2 RECOLHA DE AMOSTRAS DE TECIDOS COM LESÕES COMPATÍVEIS COM TUBERCULOSE

Após a evisceração das carcaças, o médico-veterinário procedeu à recolha de amostras dos órgãos dos animais reprovados por apresentarem lesões compatíveis com tuberculose. As amostras recolhidas foram acondicionadas em copos esterilizados de 40 ml, com tampa de rosca. Em seguida, os recipientes foram identificados com o número de série, que também era

aplicado no respetivo animal (Figura 11). Nesse rótulo constava a espécie a que a amostra pertencia, o sexo e a idade.



Figura 12 - Identificação da rês com o selo fornecido pela DGAV (Fotografia do autor).

Para além da identificação no rótulo com o número de série correspondente ao animal, foi também colocado o tipo de amostra, de acordo com a seguinte codificação: LMand (linfonodo submandibular), LR (linfonodo retrofaríngeo), LT (linfonodo traqueo-brônquico), LMes (linfonodo mesentérico) ou P (pulmão). Em seguida, foi colocado numa ficha de campo o número de série da amostra, bem como a espécie, sexo, idade e o tipo de amostra recolhida.

Posteriormente as amostras foram acondicionadas numa mala térmica com termoacumuladores, de modo a manter a temperaturas de refrigeração. As amostras que iriam ser sujeitas a bacteriologia e histopatologia foram refrigeradas à temperatura de 5° C e enviadas para o INIAV até 48 horas após a sua recolha.

Toda a informação recolhida acerca das explorações em formato PDF foi armazenada numa base de dados criada com o programa Excel 2013, recorrendo também ao auxílio dos programas: SAS® (Statistical Analysis System), e do SPSS® (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp).

À semelhança da organização dos dados das explorações de bovinos também os dados das montarias (data e local da montaria: espécie, sexo e idade) foram organizados pelo programa Excel 2013, de modo a construir uma base de dados. Em seguida, recorreu-se ao auxílio do SAS® (Statistical Analysis System) e do SPSS® (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp). O critério idade foi dividido em duas categorias: jovem (até um ano de idade) e adulto (superior a um ano de idade), estabelecidos em função do exame de dentição (número de dentes, desgaste e presença de pré-molares de leite ou definitivos).

4. RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE I- FOCOS DE TUBERCULOSE EM BOVINOS NO NÚCLEO DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA DE SERPA

4.1.1 CARACTERIZAÇÃO DAS EXPLORAÇÕES COM FOCOS DE TUBERCULOSE

A vigilância da TB na zona em estudo é conseguida pela complementaridade entre dois meios de diagnóstico: a prova de IDTC e no matadouro pela inspeção sanitária levada a cabo pelo médico-veterinário.

Verifica-se que das 195 explorações saneadas registaram-se 10 focos de tuberculose em bovinos (5,13% das explorações), cuja dimensão das explorações confirmadas correspondia a dimensões de 100 a 249 bovinos, por curiosidade as de dimensão mais frequente na zona em estudo (Gráfico 2).

Com base nos dados recolhidos, existe uma maior percentagem de explorações com focos de tuberculose no concelho de Barrancos, correspondente a (12,5%) do total de explorações, ou seja, cinco explorações com casos positivos de tuberculose. No concelho de Moura, surgiram cinco explorações com casos positivos de tuberculose, o que corresponde a (3,23%) (Gráfico 2; Figura 13). De notar que no concelho de Barrancos se registaram 40 explorações saneadas, em relação a 155 explorações no concelho de Moura.

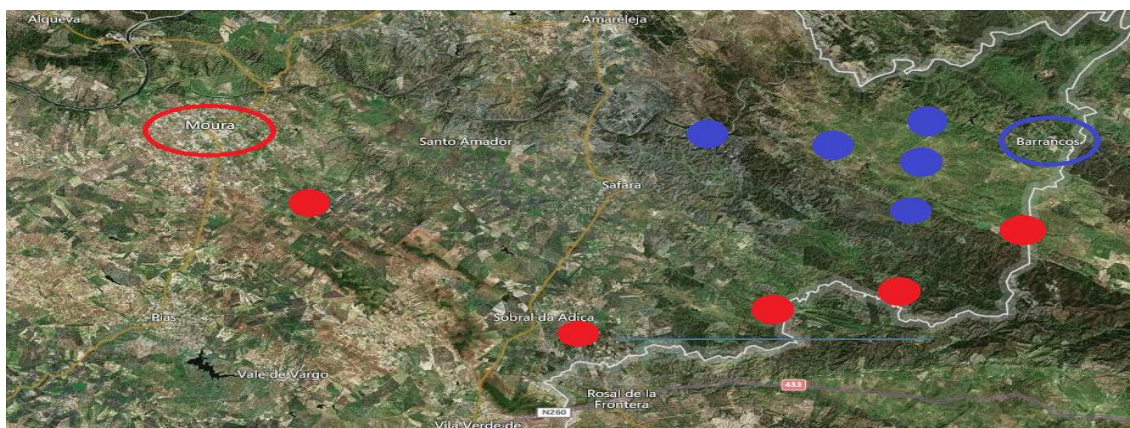


Figura 13 - Localização dos focos ativos de tuberculose no Núcleo de Alimentação e Veterinária de Serpa, entre Março de 2014 a Fevereiro de 2015.

- - Explorações de bovinos com casos positivos no concelho de Moura;
- - Explorações de bovinos com casos positivos no concelho de Barrancos;

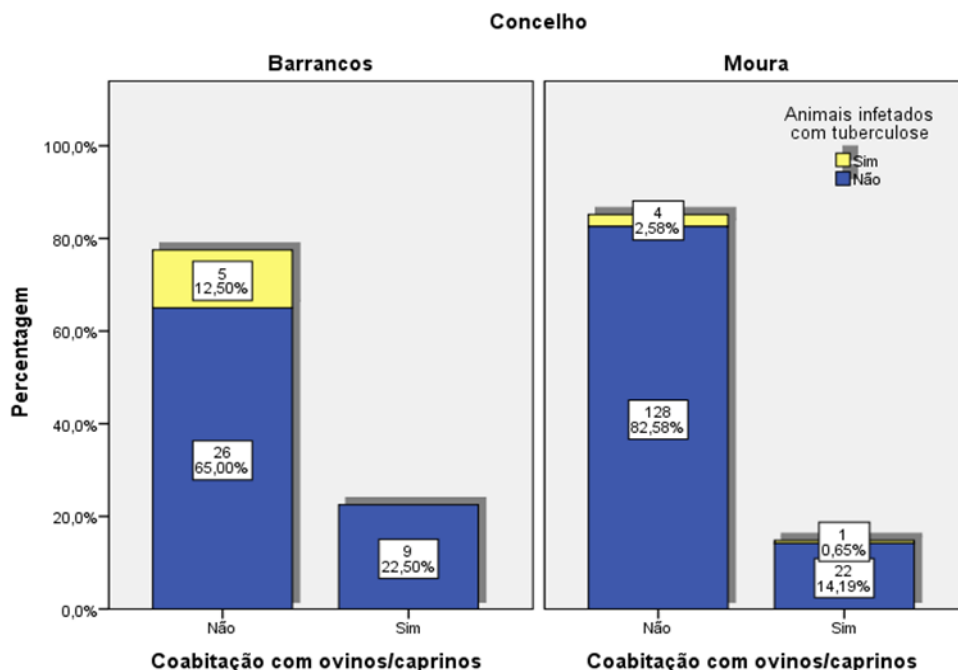


Gráfico 2 - Distribuição das explorações com e sem bovinos infectados, que coabitam ou não com ovinos/caprinos nos concelhos de Barrancos e Moura respetivamente (N=195)

Das 195 explorações em estudo, verificou-se que em 32 (16,41%), os bovinos coabitam com ovinos e/ou caprinos (Gráfico 2). Vinte e três pertenciam ao concelho de Moura, o que prefaz 14,84% das explorações deste concelho, e nove (22,50%) pertenciam ao concelho de Barrancos. Apenas uma (0,65%) exploração no concelho de Moura, tinha bovinos infectados em coabitação com ovinos e/ou caprinos (Figura 14). Todas as restantes explorações com casos positivos tinham exclusivamente bovinos no efetivo, como é possível observar no gráfico 2 (Barrancos 12,50% e Moura 2,58%).



Figura 14 - Exploração onde coabitam bovinos e ovinos (Fotografia do autor).

4.2 ATIVIDADE II - ACOMPANHAMENTO DAS SEIS MONTARIAS

Foram abatidos 120 animais nas caçadas realizadas no concelho de Moura e 128 animais nas montarias realizadas no concelho de Barrancos, prefazendo um total de 248 animais abatidos.

Pela leitura do gráfico 3, pode verificar-se que a tuberculose apresentou uma prevalência em animais de montaria de 2,82% (N= 7/248). Em veados a prevalência de tuberculose foi a mais elevada, correspondendo a 3,14% (N=6) dos 191 veados, perante os 1,75% (N=1) nos 57 javalis estudados. A prevalência na totalidade dos machos foi de 6,73% (N=104), em animais adultos foi de 4,07% (N=172), 5,4% (N=128) dos animais capturados no concelho de Barrancos. Não se detetaram LCT em animais provenientes do concelho de Moura.

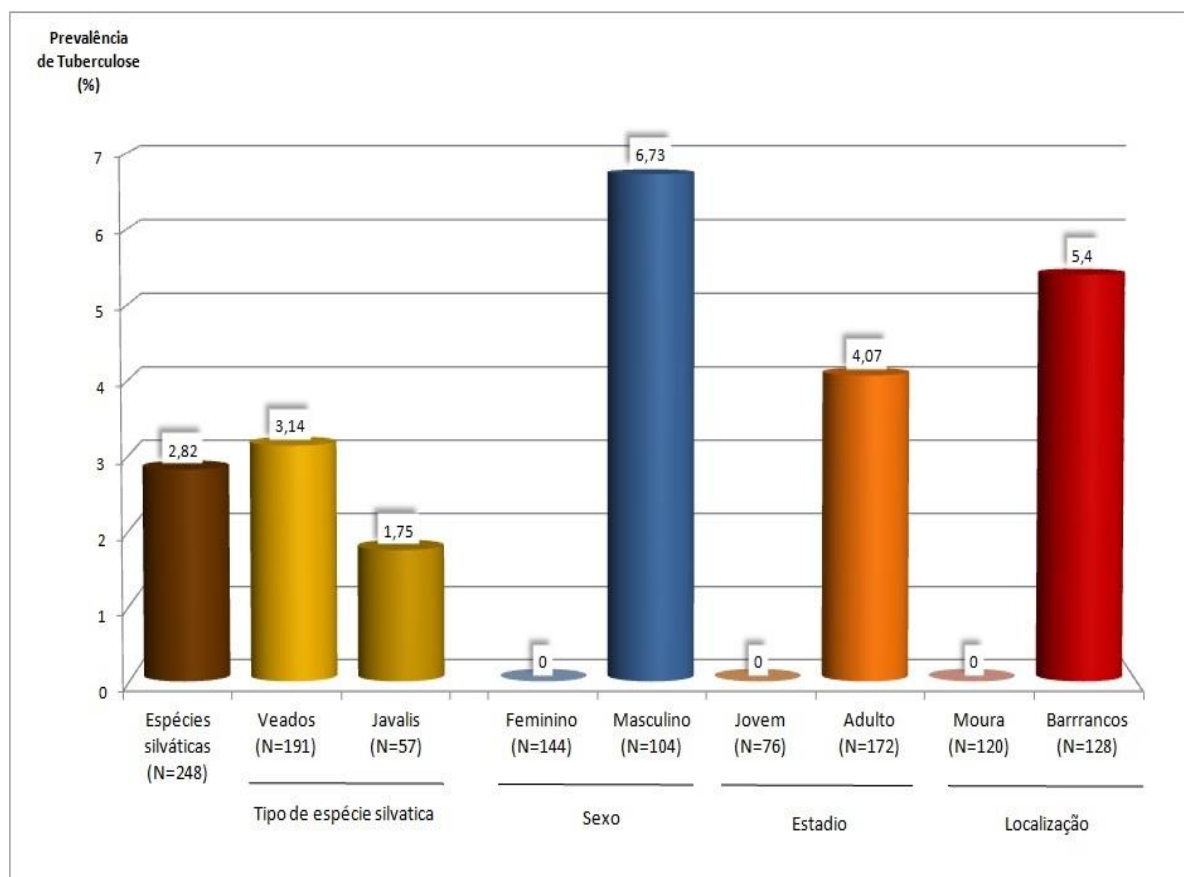


Gráfico 3- Prevalência de tuberculose em javalis e veados, de acordo com o sexo, idade e localização (concelho) (N=248)

4. 2. 2 INSPEÇÃO MACROSCÓPICA E RECOLHA DE AMOSTRAS

Dos 248 animais abatidos, sete (2,82%) foram rejeitados por suspeita de tuberculose (Figura 15; Tabela 1). Todos os animais rejeitados foram abatidos no concelho de Barrancos (Figura 16).

Todas as amostras que apresentavam lesões compatíveis com tuberculose foram enviadas e analisadas no INIAV através de exames histopatológicos e bacteriológicos.

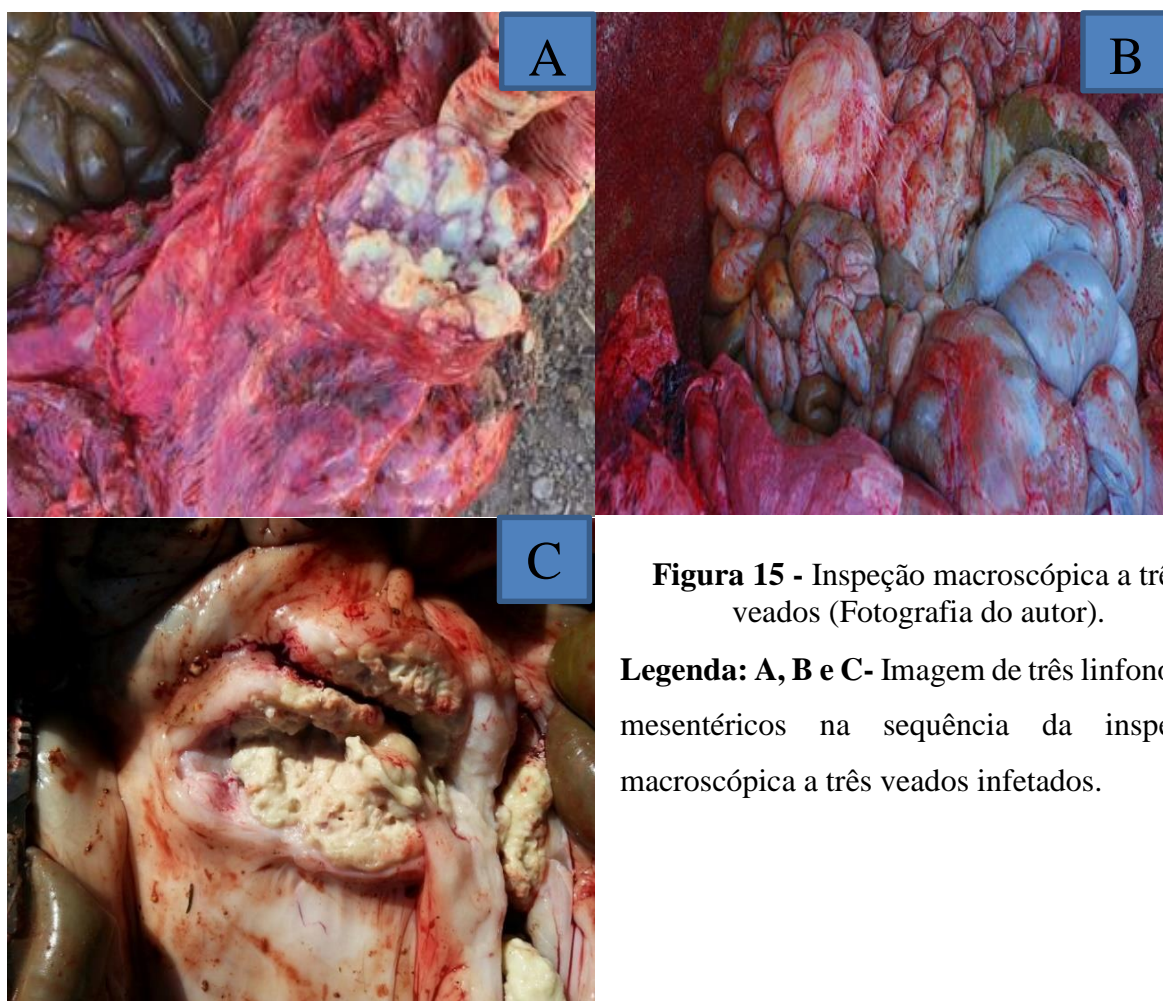


Figura 15 - Inspeção macroscópica a três veados (Fotografia do autor).

Legenda: A, B e C- Imagem de três linfonodos mesentéricos na sequência da inspeção macroscópica a três veados infetados.

Tabela 1 - Animais de montaria com lesões compatíveis com tuberculose

Caraterização por espécie, sexo e idade				
Idade	Sexo	Veado	Javali	Total
Jovem	Masculino	0	0	0
	Feminino	0	0	0
Adulto	Masculino	6	1	7
	Feminino	0	0	0
População				
Total		191	57	248

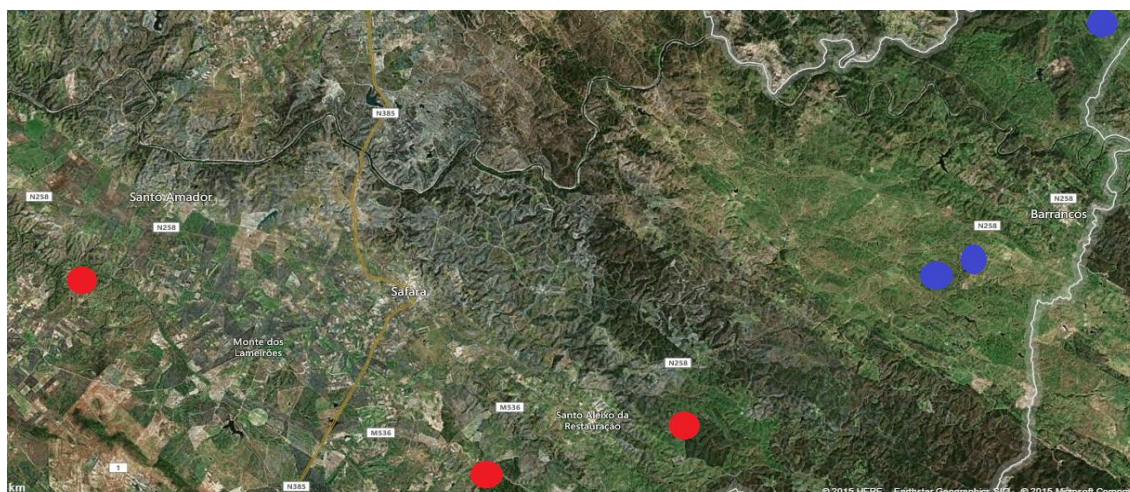


Figura 16 - Localização geográfica das seis montarias realizadas nos concelhos de Moura e Barrancos.

- - Montarias realizadas no concelho de Moura;
- - Montarias em que foram confirmados casos positivos de tuberculose;

O bacilo *Mycobacterium bovis* foi isolado pelo método Gold Standard em todas as amostras, dos sete animais rejeitados, enviadas para análise. Este resultado foi corroborado pela visualização de BAAR pela coloração de Ziehl-Neelsen. Em todas as amostras foi descrita a presença de granulomas com macrófagos mononucleados e multinucleados com linfócitos na sua constituição, tendo sido relatado numa das amostras a presença de infiltração intensa e difusa por eosinófilos. Deste modo, a infecção foi confirmada nos 6 veados, adultos, (3,14% dos veados caçados) e no javali, também ele adulto, (1,7% dos javalis caçados) rejeitados na avaliação sanitária.

5. DISCUSSÃO

5.1 ATIVIDADE I- FOCOS DE TUBERCULOSE NO NÚCLEO DE ALIMENTAÇÃO E VETERINÁRIA DE SERPA

Este estudo permitiu identificar 10 focos ativos de tuberculose bovina nos dois concelhos avaliados. A partir das explorações com focos ativos foi possível determinar a localização geográfica de cada exploração e saber o número de bovinos por exploração, assim como saber se os animais, se coabitavam ou não com ovinos e/ou caprinos. Contudo, não foi possível avaliar se nas explorações positivas tinham dado entrada novos animais, que pudessem dessa forma estar infetados e estar na origem do foco.

Os bovinos são considerados os hospedeiros naturais do *M. bovis*. À medida que as campanhas de erradicação da tuberculose em bovinos foram avançando e conseguindo taxas de prevalência e incidência mais baixas, verificou-se um aumento de casos de tuberculose na fauna selvagem, comprometendo o sucesso das referidas campanhas. A IDTC, considerada uma prova oficial para o controlo da tuberculose bovina quando efetuada por veterinários constitui um meio de diagnóstico imprescindível para o controlo desta doença. A associação entre esta prova e a inspeção sanitária em matadouro é considerada a melhor forma de controlo da tuberculose bovina (Gordejo & Vermeesch, 2006).

Contudo, o número de bovinos detetado como positivo em matadouro tem vindo a aumentar pelo aparecimento de falsos-negativos à prova da tuberculina, os quais podem traduzir casos recentes de tuberculose, com menos de 6 semanas após a infeção ou casos avançados; por outro lado vacas paridas nas seis semanas precedentes ao teste, animais dessensibilizados pela administração de tuberculina nos 8 a 60 dias precedentes e animais com idade avançada também podem dar um resultado falso negativo à IDTC (Radostits *et al.*, 2000). A todos estes fatores

podem aliar-se eventuais irregularidades na execução do teste de rastreio, nomeadamente por falhas no fabrico das tuberculinas que são utilizadas ou fatores inerentes à rotina de administração e respetiva leitura, que podem levar à não detecção de animais infetados, tais como: a contenção inadequada dos animais a serem rastreados; más condições do equipamento utilizado; erros da própria pessoa operadora que rastreia, devido muitas vezes à falta de preciosismo; podem também surgir casos como a utilização de tuberculina exposta ao calor por longos períodos de tempo; a utilização de tuberculina fora do prazo de validade; a não certificação da inoculação intradérmica da quantidade exata de tuberculina; a leitura da tuberculina feita após o período recomendado, e erros na medição da espessura da prega de pele.

Os concelhos de Moura e Barrancos são fortemente habitados por espécies silváticas, o que faz com que se proporcione uma maior possibilidade de contato entre animais silváticos e animais de produção, e, consequentemente haja uma maior partilha de espaços comuns, como pontos de abeberamento, alimentação, locais de dormida e de refúgio. Este é um fator crucial na transmissão desta doença, uma vez que as principais vias de contágio são a via respiratória e a via digestiva (Goodchild & Clifton-Hadley, 2001), a última através do consumo de alimentos ou água contaminada, ou através do consumo de carcaças infetadas (Gortazar, 2003), levantando fortes suspeitas de que nestes concelhos a transmissão para os animais de produção seja feita através dos animais silváticos.

Nas explorações de regime extensivo e nas explorações onde é frequente o pastoreio dos animais, pode ter importância como reservatório de *M. bovis* a fauna selvagem. Cada vez mais surgem situações com dados que comprovam que na Península Ibérica, o javali e o veado possam ser considerados como potenciais hospedeiros reservatórios do agente da tuberculose bovina, sendo não só capazes de manter a infeção, como de transmiti-la a outras espécies (Naranjo *et al.*, 2008; Duarte, 2007; Santos, 2007). Segundo Santos (2007), a confirmação de tuberculose em javalis na Beira Interior e no Baixo Alentejo, está substancialmente relacionada tanto com a elevada densidade como com a diversidade de ungulados silváticos e, especialmente, com a densidade de javalis. Desta forma, quando há uma sobrepopulação em determinada área, maior é a possibilidade de existir um contato intra-espécies como inter-espécies, potencializando a transmissão da infeção dentro da própria população e em populações vizinhas.

No entanto, o sistema nacional de inspeção sanitária de ungulados silváticos abatidos em atividades cinegéticas realizado por veterinários autorizados (edital nº1/2011 da DGAV)

abarca uma amostragem muito reduzida em relação à sua totalidade, não dando garantias de proteção para a saúde animal e para a saúde pública (DGAV, 2011b).

A diferença de percentagem de explorações com focos de tuberculose entre os dois concelhos poderá estar relacionada com o facto de que, segundo resultados de caçadas e de relatos por parte de habitantes do concelho, o concelho de Barrancos é tido como mais habitado por animais silváticos em relação ao concelho de Moura, o que também é constatado com base em provas da sua presença, em comedouros, bebedouros e zonas de passagem.

Contudo, embora os valores obtidos apontem para uma maior existência de animais silváticos no concelho de Barrancos, é desconhecida a densidade exata dos mesmos. Por outro lado os dois concelhos são limítrofes, pelo que o movimento dos animais entre os dois poderá ocorrer livremente. A elevada densidade do hospedeiro silvático será certamente um fator de risco. Como é possível constatar nos dados apresentados na figura 13, as explorações em que foram confirmados casos positivos de tuberculose encontram-se relativamente próximas. De modo que é possível que haja transmissão pelas diversas vias de infeção a partir dos animais silváticos que se encontram presentes nesta região.

Nas explorações bovinas que estão sobre um regime extensivo, como é o caso da totalidade das abordadas na presente dissertação, em épocas de maior défice tanto alimentar como de fontes de água (mais evidentes nos meses mais quentes do ano), leva a que haja uma maior concentração de animais em pontos de alimentação suplementar e que bebam a partir de fontes de água estagnada ou de curso lento. Todas estas circunstâncias contribuem para a disseminação da doença. Ainda se torna mais evidente quando existem animais silváticos para além dos bovinos, uma vez que existem zonas em que não há qualquer tipo de limite, como cercados, que são áreas delimitadas por vedações com animais silváticos no seu interior. De referir também que as vedações utilizadas para restringir a área utilizada pelos bovinos, não oferecem qualquer tipo de obstáculo, tanto aos veados que muitas vezes as saltam, como aos javalis que conseguem foçar fazendo uma passagem sob a mesma.

Não é possível afirmar que houve contacto entre os animais silváticos e animais de explorações infetadas, mas pode sim afirmar-se que os casos que foram diagnosticados com tuberculose em animais silváticos foram relativamente próximo das explorações com focos de tuberculose. Uma vez que os animais silváticos são animais que percorrem longas distâncias ao longo do dia, torna-se o pressuposto mais provável. Outro fator também importante na avaliação da transmissão desta doença, e que foi evidenciado neste estudo, foi o agrupamento das explorações de acordo com o tamanho do efetivo. A partir dos dados recolhidos verificou-se que as explorações que se encontravam sob sequestro apresentavam efetivos na ordem dos 100

a 249 bovinos, e embora, este intervalo de bovinos representasse o maior número de explorações, proporciona uma maior concentração entre os animais nas alturas de maior carência alimentar. Ainda que não seja um intervalo reduzido quanto ao número de animais, não deixa de ser relativo, pois para ser um dado mais objetivo teria sido importante saber qual a área abrangida por cada efetivo para depois fazer uma proporção de animal por área, e só depois verificar se há uma sobrepopulação na área a que corresponde o respetivo efetivo. De facto a transmissão de uma doença dentro de uma exploração tem uma maior probabilidade de ocorrer quanto maior for a proximidade entre os animais, tendo por isso como fatores de risco, o sistema de produção (extensivo ou intensivo), o tamanho da manada e as medidas de manejo e biossegurança da exploração (Goodchild & Clifton-Hadley, 2001). De salientar, que os caprinos são mais suscetíveis à infeção por *M. bovis* que os ovinos. De forma que é fundamental ter sempre em consideração a introdução de caprinos infetados em explorações de bovinos. É também importante referir que algumas explorações praticavam a transumância em certas alturas do ano, geralmente entre a Primavera até ao início do Inverno, proporcionando que os bovinos coabitassem nas pastagens com outros efetivos de diferente situação sanitária.

Contudo, entre as explorações do concelho de Moura confirmadas com focos de tuberculose, constava uma que mantinha coabitação com ovinos e/ou caprinos. Sendo os caprinos uma espécie suscetível a tuberculose poderá no entanto ter havido transmissão entre esta espécie e os bovinos, ou até mesmo no caso de coabitarem ovinos e não caprinos também estes poderão atuar ou não como vector, ainda que não sejam uma espécie suscetível à infeção pelo *Mycobacterium*, transportando consigo a micobactéria.

5. 2 ATIVIDADE II- ACOMPANHAMENTO DAS SEIS MONTARIAS

A amostragem em estudo assenta na recolha de amostras de animais abatidos em apenas seis montarias pelo que esta poderá não ser representativa da população presente na zona de estudo.

Contudo, a partir dos resultados obtidos, confirma-se a presença de tuberculose causada por *M. bovis* em veados e javalis, nos concelhos em estudo. De referir, que nos sete animais que apresentavam lesões macroscópicas compatíveis com tuberculose a presença de infeção por *M. bovis* foi confirmada em todos pelo isolamento da micobactéria.

Embora no presente estudo a maioria (n=6) dos animais positivos sejam veados, de acordo com Santos (2007) existe uma maior prevalência de tuberculose em javalis, atribuindo-

se ao fato destes animais terem uma maior sociabilidade intra-específica, e o fato de uma fêmea ter um maior número de crias que uma cerva, e se for o caso da mãe estar infectada existe uma grande probabilidade de transmitir às crias e, conseqüentemente, maior é o número de animais infectados. Com base nos dados em estudo, o número de javalis abatidos foi inferior a um terço do total de animais abatidos, de forma que houve desde logo uma maior probabilidade para que fossem encontrados mais casos de tuberculose em veados.

Relativamente ao sexo, todos os animais positivos eram do sexo masculino. A maioria dos estudos não confirma desproporções significativas de prevalência entre sexos, ainda assim há casos de maior prevalência, quer em fêmeas, quer em machos (Vicente *et al.*, 2006; Bengis *et al.*, 1999). Quanto à maior prevalência da infeção em fêmeas, pode atribui-se ao fato do enfraquecimento do sistema imunitário durante a gestação (Bengis, 1999), enquanto nos machos a sua transmissão possa surgir como resultado das lutas, no caso de veados adultos (Santos, 2006) ou no caso dos javalis (Blanco, 1998), pelo acesso às fêmeas durante o cio ou pela disputa pelo alimento. Ainda assim estas lutas resultam em golpes nas regiões laterais, apesar de ser menos provável que a transmissão ocorra por esta via (Santos, 2007).

Visto que a tuberculose é uma doença de evolução crónica a prevalência tende a aumentar com a idade (Bengis, 1999; Vicente *et al.*, 2006). Os dados obtidos no presente estudo vão de encontro ao estudo de Bengis, uma vez que todos os animais infectados com *M. bovis* eram adultos. No entanto, há dados que sofrem um desvio à tendência da prevalência da tuberculose aumentar com a idade. São elas:

- A transmissão da mãe para o filho no período pós-parto (Vicente *et al.*, 2006) devido a lesões nas glândulas mamárias (Martín-Hernando *et al.*, 2007)
- A progressão rápida da doença pelo desenvolvimento de lesões abertas, mais comuns em animais jovens mesmo que não sejam tão comum em javalis (Martín-Hernando *et al.* 2007).

Uma vez que os dois concelhos em estudo se encontram incluídos na zona de risco epidemiológico de tuberculose, é sempre destinado, por lei, um médico veterinário por montaria para fazer a inspeção sanitária. Desta forma, os dados obtidos são confiáveis, e esta parece ser a única forma de monitorizar e controlar a tuberculose em animais silváticos.

É de referir que os dados obtidos na inspeção sanitária realizada em montarias, podem não representar a realidade da prevalência de infeção existente nos focos epidemiológicos de tuberculose, uma vez que os dados se referem estritamente àquele dia, e aos animais que se encontravam na zona que ocorreu a montaria.

O controlo desta doença é muito complicado, pelo que, a introdução de técnicas ou modos de caça diferenciados em relação a cada espécie, e em várias alturas do ano poderá ser a melhor forma de monitorizar tuberculose nestas espécies. Por exemplo, nas montarias, poderia ser feita primeiro uma solta de matilhas de cães para que se caçam veados, tendo em conta o comportamento destes animais e uma vez que entram em fuga mais rápido; e uma hora depois soltar as restantes matilhas de modo a caçar os javalis, que normalmente acabam por ser ultrapassados pelas matilhas, sendo este o motivo por que não constam em tão grande número como os veados no resultado final das montarias.

Uma situação que foi verificada em todas as montarias foi o descuido por parte das pessoas destinadas a executarem o encaminhamento dos subprodutos para os locais de enterro, assim como a não utilização de roupa de proteção e de luvas esterilizadas, embora tenham sido alertados pelo médico veterinário. Este facto demonstra a falta de conhecimento acerca de possíveis perigos de contato com as vísceras e carcaças de animais silváticos assim como o desconhecimento das suas possíveis consequências.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, confirmou-se a existência de *M. bovis* em javalis e veados de vida livre, nos concelhos de Moura e Barrancos, onde estas espécies coabitam com animais de produção, predominantemente bovinos. Com o estudo realizado não seria esperado confirmar a transmissão de tuberculose entre os animais de produção e silváticos, mas sim confirmar a hipótese de tal ocorrer tendo em conta os fatores de risco propícios à propagação da doença. Como tal, do presente estudo pode concluir-se:

- Nas zonas onde foram realizadas as caçadas existem explorações de 100 a 249 animais (média/grande dimensão) que praticam o regime de pastoreio livre, havendo tanto a possibilidade da doença ser transmitida por contato com outros bovinos como pelo contato com animais silváticos;
- Os períodos atingidos pelas carências alimentares, em que os criadores se veem obrigados a alimentar o gado à base de concentrados, e cereais em comedouros situados em zonas que não são impeditivas à invasão pelos animais silváticos, potencia o contato entre as diferentes espécies;
- Nos efetivos bovinos onde seja confirmada a infeção, seria essencial uma assistência aos mesmos de forma a contribuir para uma rápida e eficaz eliminação dos focos;
- Em efetivos confirmados com infeção faz parte do plano de erradicação o abate sanitário, no entanto não existe nenhuma medida preventiva de controlo implementada ao nível dos animais silváticos, ainda que possa ser confirmada uma relação epidemiológica;
- Seria também de incentivar uma análise mais pormenorizada dos casos confirmados com tuberculose, para que fossem identificados os possíveis fatores de risco e daí intervir de forma a evitá-los;
- Seria também determinate que fossem desenvolvidas técnicas de análise de sequências de DNA, a partir de genotipagem, de forma a comprovar se existem relações epidemiológicas entre as estirpes de *Mycobacterium* isoladas.

Tendo em conta estes factos, seria importante a realização de estudos com recurso a métodos mais rigorosos como a biologia molecular, de forma a uma melhor compreensão da epidemiologia da doença. Ainda que hajam estudos que confirmem a transmissão de tuberculose entre os animais silváticos e os animais de produção, é primordial saber qual o

papel dos animais silváticos na epidemiologia da doença, e se se comportam como hospedeiros reservatórios, para que seja feito um melhor controlo da fauna silvática. Dado que o javali e o veado são animais silváticos de vida livre, deverão ser tomadas medidas de forma a evitar o risco de transmissão, como manter os efetivos bovinos que estão localizados em zonas de risco sobre um rigoroso confinamento de forma a evitar o contacto entre espécies e uma melhor gestão em termos de encabeçamento dos efetivos nas alturas de maior carência alimentar, para que não se reúnam condições propícias ao contato entre espécies.

Relativamente ao controlo da tuberculose em bovinos seria importante avaliar se a prova de IDTC é o método mais fiável no diagnóstico da doença ou se será necessário recorrer a outras novas formas de diagnóstico. A tuberculose bovina continua a ser um problema a nível sanitário por resolver no nosso país, e apesar da situação económica que Portugal atravessa, seria crucial os esforços de todos os intervenientes diretos e indiretos na luta para a erradicação da doença, sem esquecer o potencial papel dos animais silváticos na sua transmissão.

Aos animais silváticos cinegéticos em determinadas zonas dever-lhes-ia ser aplicado um estatuto sanitário, tal como é feito nos animais de produção. Inicialmente, deveria ser feito um recenseamento aproximado dos animais existentes, e a partir dos animais abatidos ser-lhes-ia feito um rastreio, a partir do qual lhes era aplicado um estatuto sanitário. Seria também vantajoso fazer um desbaste periódico e, conseguinte rastreio, ao longo do ano em função do número, área e estado como medida alternativa à tuberculinização, como sucede nos bovinos.

BIBLIOGRAFIA

- Abalos, P. & Retarnal, P. (2004). Tuberculosis: una zoonosis re-emergente? *Revue Scientifique Technique. Office International Épizooties*, 23 (2): 583-594
- Abrahão, R.M.C.M. (1998). *Tuberculose humana causada pelo Mycobacterium bovis: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais*. Tese de Mestrado. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo
- Alfonso L. (2007). Respiratory System. In McGavin, M. D. & Zachary, J. F., *Pathologic Basis of Veterinary Disease* (4^a ed., pp.534, 526-527). Mosby Elsevier.
- Alexander, K.A., Laver, P.N., Michel, A.L., Williams, M., van Helden, P.D., Warren, R.M. & van Pittius, N.C. (2010). Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerging Infectious Diseases*, 16, DOI:10.3201/eid1608.100314.
- Ameni, G., Aseffa, A., Engers, H., Young, D., Gordon, S., Hewinson, G. & Vordermeier, M. (2007). High prevalence and increased severity of pathology of bovine tuberculosis in Holsteins compared to zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. *Clinical Vaccine Immunologic*, 14: 1356–1361.
- Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A. & Domínguez, L. (2003). Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1785-1789.
- Aranaz, A., Juan, L., Montero, N., Sánchez, C., Galka, M., Delso, C., Álvarez, J. *et al.* (2004). Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *Journal Clinical Microbiologic*, 42 (6): 2602-2608
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (2010). A época da caça está a chegar. *ASAEnews n° 28*. Lisboa: ASAE.
- AFN & DGAV- Autoridade Florestal Nacional & Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (2010). *Guia de boas práticas higio-sanitárias: Caça maior*. Lisboa
- Bengis, R. (1999) Tuberculosis in free-ranging mammals. *in* M. Fowler e R. Miller (eds.) *Zoo and wild animal medicine, current therapy* 4. W. B. Saunders Company, Philadelphia, p. 101-114.

Bengis, R.G., Kock, R.A. & Fischer, J. (2002). Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. *Revue Scientifique Technique. Office International Épizooties*, 21(1), 53-65.

Bezoz, J., Álvarez, J., Romero, B., Juan de L. & Domínguez, L. (2014). Bovine tuberculosis: Historical perspective. *Research in Veterinary Science*

Biberstein, E.L. & Hirsh, D.C. (2004). Mycobacterium. In D.C. Hirsh, N.J. MacLachlan & R.L. Walker (Edits.), *Veterinary microbiology* (2nd ed.). (pp. 223-234). Iowa: Blackwell Science Ltd, Blackwell Publishing.

Blanco, J. (1998). Mamíferos de España II, Cetáceos, Artiodáctilos, Roedores y Lagomorfos de la península Ibérica, Baleares y Canarias. Editorial Planeta, Barcelona, pp. 383

Blancou, J. (2003). *History of the surveillance and control of transmissible animal diseases* (pp. 223-234). *Office international des Épizooties*

Bourne, J. (2007) Independent Scientific Group on Cattle TB. Bovine TB: The Scientific Evidence: A Science Base for a Sustainable Policy to Control TB in Cattle- An Epidemiological Investigation into Bovine Tuberculosis.

Brosch, R., Pym, A.S., Gordon, S.V. & Cole, S.T. (2001). The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends in Microbiology*, 9(9), 452-458.

Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., *et al.* (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 3684-3689.

Cassidy, J.P. (2006). The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Veterinary Microbiology*, 112, 151-161.

Coetzer, J. A. W. & Tustin, R. C. (2004). *Infectious Diseases of Livestock* (2^a ed., vol. 3, pp. 1965-1969, 1973-1987). Oxford Southern Africa.

Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., *et al.* (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393, 537-544.

Collins, J. (2001). Tuberculosis in cattle: new perspectives. *Tuberculosis*, 81 (1/2): 17-21

Collins, J.D. (2011). Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology*, 151: 2-7.

Corner, L. A. (1994). *Post mortem* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, 40, 53-63.

Corner, L. A. (2006). The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Veterinary Microbiology*, 112 (2-4): 303-312.

Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Ravigliione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., *et al.* (1998). Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Diseases*, 4(1), 59-70.

Costa, P., Amaro, A., Ferreira, A. S., Machado, D., Alburquerque, T., Couto, I., Botelho, A. *et al.*, (2014). Rapid identification of Veterinary-relevant *Mycobacterium tuberculosis* complex species using 16SrDNA, IS6110 AND Regions of Difference-targeted dual-labelled hydrolysis probes. *Journal of Microbiological Methods*, 107: 13-22

Cousins, D., V. & Roberts, J. L. (2001). Australia's campaign to eradicate bovine tuberculosis: the battle for freedom and beyond. *Tuberculosis*, 81 (1/2), 5-15.

Cousins, D.V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., Duignan, P., *et al.* (2003). Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1304-1314.

Cunha, M.V., Matos, F., Canto, A., Albuquerque, T., Alberto, J.R., Aranha, J.M., Vieira-Pinto, M., *et al.* (2011). Implications and challenges of tuberculosis in wildlife ungulates in Portugal: A molecular epidemiology perspective. *Research in Veterinary Science*, doi:10.1016/j.rvsc.2011.03.009

de Kantor, I.N. & Ritacco, V. (2006). An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Veterinary Microbiology*, 112, 111-118.

de Kantor, I. N., Ambroggi, M., Poggi, S., Morcillo, N., Telles, M. A. DA S., Ribeiro, M. O., Torres, M. C. G., *et al.*, (2008). Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis*, 88: 358-365. Mosby Elsevier

de Lisle, G.W., Bengis, R.G., Schmitt, S.M. & O'Brien, D.J. (2002). Tuberculosis in free-wildlife: detection, diagnosis and management. *Revue Scientifique et Technique Official International Épizooties*, 21(2),pp. 317-324.

de Mendoza, J.H., Parra, A., Tato, A., Alonso, J.M., Rey, J.M., Peña, J., García-Sánchez, *et al.* (2006). Bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and cattle (*Bos taurus*) in a Mediterranean ecosystem (1992–2004). *Preventive Veterinary Medicine*, 74, 239–247.

DGAV- Direção Geral de Alimentação e Veterinária (2005). *Manual de Procedimentos para a realização da prova de intradermotuberculinização de comparação: no âmbito do Programa de Erradicação da Tuberculose Bovina. Comissão Consultiva dos Planos de Erradicação*: DGAV.

DGAV- Direção Geral de Alimentação e Veterinária (2009). Tuberculose Bovina- Informação sobre a doença. Acedido em 10 de Setembro de 2015 em <http://www.dgv.minagricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=23555&generico=145579&cboui=145579>

DGAV- Direção Geral de Alimentação e Veterinária (2011a). *A Problemática da Tuberculose em Ungulados Domésticos e Selvagens*

DGAV- Direção Geral de Alimentação e Veterinária (2011b). *Edital nº 1 Tuberculose em Caça Maior de 29 de abril de 2011. Direção Geral de Alimentação e Veterinária. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.*

DGAV - Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (2011c). *Plano de Controlo e Erradicação da Tuberculose em Caça Maior: Portugal.*

DGAV- Direção Geral de Alimentação e Veterinária (2015). *Programa Nacional de Controlo e Erradicação da Tuberculose Bovina para 2015: Portugal.*

Dobson, A. & Foufopoulos, J. (2001). Emerging infectious pathogens of wildlife. *Philos Trans. R. Soc. Lond.*, 356: 1001-1012

Donaghy, J. A., Rowe, M. T., Rademaker, J. L. W., Hammer, P., Herman, L., Jonghe, V. De, Blanchard, B. *et al.*, (2008). Na inter-laboraty ring trial for the detection and isolation of *Mycobacterium bovis* subsp. *paratuberculosis* from raw milk artificially contaminated with naturally infected faeces. *Food Microbiology* 25 (2008) 128-135. Mosby Elsevier

Duarte, E. L., Domingos, M., Albuquerque, T., Amado, A., & Botelho, A. (2007). *Transmissão da tuberculose bovina entre espécies domésticas e silvestres em Portugal: primeiras evidências moleculares em isolados de Mycobacterium bovis de uma exploração no Alentejo* (pp, 299-303). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*

Duarte, E.M.L. (2008). *Tuberculose bovina: detecção e genotipagem de Mycobacterium bovis*. Tese de Doutoramento. Évora: Universidade de Évora.

European Food Safety Authority (2015). *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013*. EFSA. Disponível on-line. Acedido a 10 de Setembro de 2015 em www.efsa.europa.eu

Fabre, M., Hauck, Y., Soler, C., Koeck, J., van Ingen, J., van Soolingen, D., Vergnaud, G., *et al.* (2010). Molecular characteristics of „„*Mycobacterium canettii*”” the smooth *Mycobacterium tuberculosis* bacilli. *Infection, Genetics and Evolution*, DOI:10.1016/j.meegid.2010.07.016.

Ferreira, A. J. (1957). *Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos* (pp,71-121). Lisboa

Ferreira, A. J. & Ferreira, C. (1990). *Doenças Infecto-Contagiosas dos Animais Domésticos* (4ª ed., pp.60-97). Fundação Calouste Gulbenkian.

Fonseca, A. P. (2011). *Problemática da tuberculose em ungulados domésticos e selvagens*. Moura, Portugal.

Goodchild, A.V. & Clifton-Hadley, R.S. (2001). Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*, 81(1/2), 23-41.

Gordejo, F.J. & Vermeersch, J.P. (2006). Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. *Veterinary Medicine*, 112, 101–109.

Gortazar, C., Vicente, J. & Gavier-Widén, D. (2003). Pathology of bovine tuberculosis in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Veterinary Record*, 152: 779-780

Grange, M. J. & Zumla, A. I. (2009). Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and related animal pathogens. *Tuberculosis, A Comprehensive Clinical Reference* (pp. 16-163). Mosby Elsevier

Griffin, J.M., Martin, S.W., Thorburn, M.A., Eves, J.A. & Hammond, R.F. (1996). A case-control study on the association of selected risk factors with the occurrence of bovine tuberculosis in the Republic of Ireland. *Preventive Veterinary Medicine*, 27: 217-229.

Huard, R.C., Fabre, M., de Hass, P., Lazzarini, L.C., van Soolingen, D., Cousins, D. & Ho, J.L. (2006). Novel Genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Bacteriology*, 188(12), 4271-4287.

Hubbert, W. T., McCulloch, W. F. & Schnurrenberger, P. R. (1975). *Diseases Transmitted from Animals to Man* (6^a ed., pp. 303-304). Charles C Thomas Publisher.

Humblet, M. F., Boschioli, M. L. & Saegerman, C. (2009). Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach, *Veterinary Research*, 40-50.

Hutyra, F. V., Marek, J. & Manninger, R (1953). *Patología y Terapéutica Especiales de los Animales Domésticos* (pp, 430-518). Labor, S. A.

Jesus, J. V, F (2013). *Abates Sanitários de Tuberculose Bovina: Um Estudo Retrospectivo (2011-2012). Tese de Mestrado*. Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

John W. Davis, Lars H. Karstad & Daniel O. Trainer (1973). *Enfermedades infecciosas de los mamíferos salvajes* (pp, 286-301). Acribia

Johnson, L.K., Liébana, E., Nunez, A., Spencer, Y., Clifton-Hadley, R., Jahans, K., Ward, A., *et al.* (2008). Histological observations of bovine tuberculosis in lung and lymph node tissues from British deer. *The Veterinary Journal*, 175, 409–412

Llamazares, O.R., Martín, C.B., Nistal, D.A., Redondo, V.A., Rodríguez, L.D. & Ferri, E.F. (1999). Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. *Veterinary Microbiology*, 70, 55-66.

Martín-Hernando, M., Hofle, U., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Vidal, I D., Barral, M., Garrido, J., *et al.* (2007). Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in the European wild boar. *Tuberculosis* (Edinb.)

Menzies, F.D. & Neill, S.D. (2000). Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *The Veterinary Journal*, 160, 92–106.

Milian-Suazo, F., Harris, B., Díaz, C.A., Torres, C.R., Stuber, T., Ojeda, G.A., Loredó, A.M., *et al.* (2008). Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: usefulness in international trade. *Preventive Veterinary Medicine*, 87, 261-271.

Mostowy, S., Inwald, J., Gordon, S., Martin, C., Warren, R., Kremer, K., Cousins, D., *et al.* (2005). Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. *Journal of Bacteriology*, 187(18), 6386–6395.

Naranjo, V., Gortazar, C., Vicente, J. & Fuente, J. (2008). Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Veterinary Microbiology*, 127, 1-9.

Neill, S.D., Bryson, D.G. & Pollock, J.M. (2001). Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis*, 81(1/2), 79-86.

Neves, A. C. C. M. (2011). *A Tuberculose Bovina na Divisão de Intervenção Veterinária de Vila Real para o Triénio 2008-2010*. Tese de Mestrado. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Niemann, S., Richter, E. & Rusch-Gerdes, S. (2002). Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (Approved Lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 433-436.

Nugent, G., Whitford, J. & Young, N. (2002). Use of released pigs as sentinels for *Mycobacterium bovis*. *Journal of Wildlife Diseases*, 38(4): 665-677.

O' Reill, L. M. & Daborn, C. J. (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and Lung Disease*, 76: 1-46

OIE (2009). Chapter 2.4.7.- Bovine tuberculosis. *Terrestrial Manual*

Palmer, M.V. & Waters, W.R. (2006). Advances in bovine tuberculosis diagnosis and pathogenesis: What policy makers need to know. *Veterinary Microbiology*, 112, 181–190.

Parra, A., Larrasa, J., García, A., Alonso, J.M. & de Mendoza, J.H. (2005). Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: A first approach to risk factor analysis. *Veterinary Microbiology*, 110, 293–300.

Phillips, C.J.C., Foster, C.R.W., Morris, P.A. & Teverson, R. (2003). The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Research in Veterinary Science*, 74: 1-15.

Plana, M.A. (2004). *Bases para la inspección de la tuberculosis bovina en matadero*. Gobierno de Chile. Servicio Agrícola y Ganadero.

Pollock, J., McNair, J., Welsh, M., Girvin, R., Kennedy, H., Mackie, D. & Neill, S. (2001). Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, 81(172): 103-107

Pollock, J.M., Welsh, M.D. & McNair, J. (2005). Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108: 37-43.

Pollock, J.M., Rodgers, J.D., Welsh, M.D. & McNair, D. (2006). Pathogenesis of bovine tuberculosis: The role of experimental models of infection. *Veterinary Microbiology*, 112, 141-150.

Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonar, F. C., FitzPatrick, E. S., Fanning, S. & Hartigan, P. J. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* (2^a ed., pp. 250-261). Wiley-Blackwell.

Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C. & Hinchcliff, K. W. (2000). *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses* (9^a ed., pp. 817-840). W. B. Saunders.

Rastogi, N., Legrand, E. & Sola, C. (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue Scientifique Technique*, 20(1), 21-25.

Rothschild, B.M., Martin, L.D., Lev, G., Bercovier, H., Bar-Gal, G. K., Greenblatt, C., Donoghue, H., *et al.* (2001). *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. *Clinical Infectious Diseases*, 33, 305-311.

Rua-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H. & Clifton-Hadley, R.S. (2006). Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: A review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science*, 81, 190-210.

Santos, N. G. (2007). *A tuberculose no javali em Portugal*. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.

Santos N., Gerales M., Afonso A., Almeida V. & Correia-Neves, M. (2010). Diagnosis of tuberculosis in the wild boar (*Sus scrofa*): A comparison of methods applicable to hunter-harvested animals. *PLoS ONE*, 5(9), DOI:10.1371/journal.pone.0012663.

Shinnick, T.M. & Good, R.C. (1994). Mycobacterial taxonomy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 13(11), 884-901.

Skoric, M., Shitaye, E.J., Halouzka, R., Fictum, P., Trcka, I., Heroldova, M., Tkadlec, E., *et al.* (2007). Tuberculous and tuberculoid lesions in free living small terrestrial mammals and the risk of infection to humans and animals: a review. *Veterinarni Medicina*, 52(4), 144-161.

Sola, C., Filliol, I., Legrand, E., Makrousov, I. & Rastogi, N. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR, and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new phylogeographical clades. *Journal of Molecular Evolution*, 53, 680-689.

Thoen, C., LoBue, P. & Kantor, I. (2006). The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Veterinary Microbiology*, 112, 339–345.

Tizard, I. R. (2002) *Imunologia Veterinária – Uma Introdução* (6^a ed., pp. 384-392) Roca.

Van Soolingen, D. (2001). Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *Journal of Internal Medicine*, 249, 1-26.

Varello, K., Pezzolato, M., Mascarino, D., Ingravalle, F., Caramelli, M. & Bozzetta, E. (2008). Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, 20: 164-169.

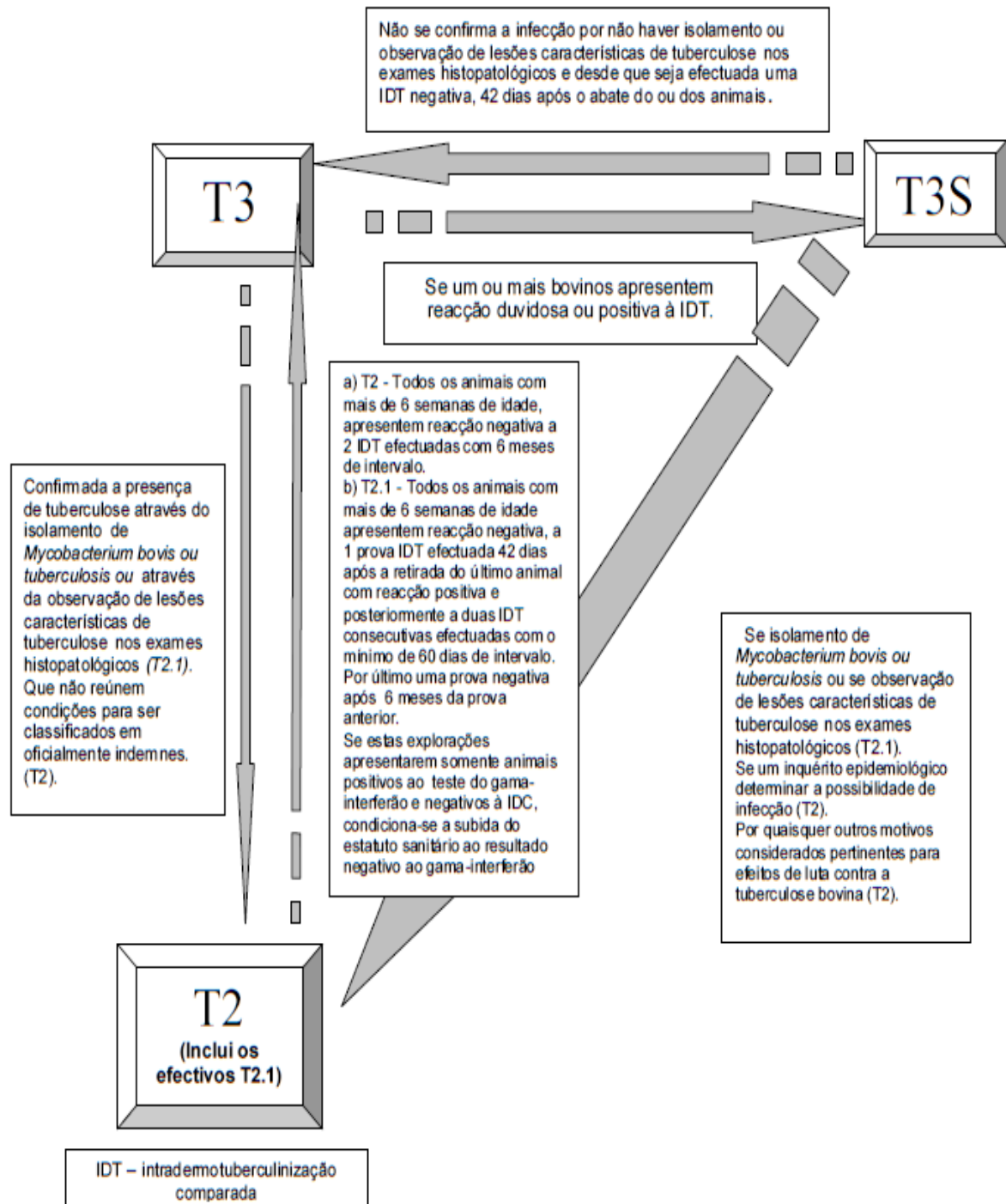
Vicente, J., Hofle, U., Garrido, J., Fernández-de-Mera, I., Acevedo, P., Juste, R., Barral, M., Gortazar, C. (2007). Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Veterinary Research*, 37: 107-119.

Waters, W. R., Maggioli, M. F., McGill, J. L., Lyashchenko, K. P. & Palmer, M. V. (2014). Relevance of bovine tuberculosis research to the understanding of human disease: Historical perspectives, approaches, and immunologic mechanisms. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 159: 113-132

Whipple, D.L. & Palmer, M.V. (2000). Reemergence of tuberculosis in animals in the United States. In Brown, C. & Bolin, C., *Emerging diseases of animals* (pp. 281-300). ASM Press.

ANEXOS

ANEXO I: Condições para a subida e descida de estatuto sanitário de um efetivo, de acordo com o PE. (Adaptado de DGAV, 2015).



ANEXO II: Comunicação/Identificação do Médico Veterinário Designado.



Ministério da Agricultura,
Mar, Ambiente e
Ordenamento do Território

DGV
Direcção-Geral
de Veterinária

COMUNICAÇÃO / IDENTIFICAÇÃO DO "Médico veterinário designado" (ao abrigo do determinado no N.º 2.2 do EDITAL N.º 1 TUBERCULOSE EM CAÇA MAIOR)

Exmo. Sr Director de Serviços Veterinários da Região (*): _____

Em cumprimento do determinado pela Sra. Directora Geral de Veterinária no n.º 2.2 do **Edital N.º 1 de Tuberculose em Caça Maior**, vimos por este meio **comunicar** a V.Exa os dados identificativos do **"médico veterinário designado"** no âmbito do nº 2.1 daquele **Edital** e que em cumprimento do mesmo estará presente na acção de caça promovida por esta entidade gestora/concessionária de zona de caça.

Os dados referentes ao médico veterinário designado, a identificação da acção de caça em questão, e os elementos identificativos da entidade gestora/concessionária de zona de caça que representamos encontram-se descritos respectivamente nos campos I e II e III do presente documento.

I. Dados do Médico Veterinário designado:			
Nome			Cédula Profissional n.º:
Telefone (s):		E-mail:	
II. Dados relativos à acção de caça a realizar (data /local):			
Designação do evento:			
Data do evento:		201	Hora de início: h Localidade:
Frequência:		Concelho:	
III. Dados relativos a entidade gestora/concessionária da zona de caça:			
Denominação da zona de caça:		N.º:	
Designação da entidade gestora/concessionária da zona de caça:			
Endereço postal da entidade gestora/concessionária da zona de caça:			
E-mail da entidade gestora/concessionária da zona de caça:			
Ponto de contacto:		Telefone/telemóvel:	

Com os melhores cumprimentos.

_____, ____ de _____ de 2010

O representante da entidade gestora/concessionária de zona de caça:

(*) A presente comunicação deve ser remetida à Direcção de Serviços de Veterinários da Região (DSVR) em que decorre a acção de caça em questão, para os endereços abaixo indicados e de forma a ser recepcionada com 48h de antecedência relativamente à data do evento.

Para selecção da DSVR a endereçar a presente comunicação, deverá ser tomada como referência a área de abrangência das DSVR definidas no mapa constante do Anexo A ao supracitado Edital.

Endereços: Direcção de Serviços Veterinários da Região do Centro (DSVRC):

- Bairro da Senhora dos Remédios-6300-535 Guarda/ Fax 271208338/ dsvrcc@dgvl-min-agricultura.pt

Direcção de Serviços Veterinários da Região do Alentejo (DSVRA):

- Rua D.ª Isabel n.º 8, 1.ª Andar-7000-880 Évora / Fax 266730590 / secretariado_dsvralentejo@dgvl-min-agricultura.pt

ANEXO III: Declaração relativa ao Resultado do Exame Inicial.



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
E DO MAR



Declaração Relativa ao Resultado do Exame Inicial

(Capítulo II, Secção IV, Anexo III do Regulamento (CE) n.º 853/2004 de 29 de Abril)

N.º _____ /20 (1)

Zona de caça de origem dos animais							
Nome da zona de caça _____		N.º _____		Localizada em _____ (município(s))			
Entidade gestora ou concessionária		Nome _____					
		Endereço postal _____					
Informações gerais							
Data do evento <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 20px;"></div>		Hora do evento <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 20px;"></div>		Pessoa responsável pelo exame inicial (nome em maiúsculas) (2): <div style="border: 1px solid black; width: 200px; height: 20px;"></div>			
Resultado do exame inicial							
Assinalar com X				Assinalar com X			
Espécie	N.º de selo	Sem alterações (3)	Com alterações	Espécie	N.º de selo	Sem alterações (3)	Com alterações
				sim/não N.º Anexo A			
				Foi necessário Anexo A? (4) <div style="border: 1px solid black; width: 50px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 50px; height: 20px;"></div>			
Descrição das alterações detetadas							
Espécie	N.º de selo	Descrição					
		sim/não		N.º Anexo B		Se forem detectadas características anormais, as vísceras, com excepção dos estômagos e intestinos, devem obrigatoriamente acompanhar a carcaça.	
Foi necessário Anexo B?(5)		<div style="border: 1px solid black; width: 50px; height: 20px;"></div>		<div style="border: 1px solid black; width: 50px; height: 20px;"></div>			
Assinatura							
A pessoa responsável pelo exame inicial (2): <div style="border: 1px solid black; width: 300px; height: 30px;"></div>				N.º CP se Méd. Veterinário: <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 30px;"></div>			

1) n.º sequencial por declarante / ano em curso.

2) Nas zonas de risco, a pessoa responsável pelo exame inicial é o Médico Veterinário designado.

3) Não foi observado comportamento anormal antes do abate, não existe suspeita de contaminação ambiental e não foram detetadas características anormais no exame inicial.

4) Quando o n.º de animais for superior a 12.

5) Quando o n.º de animais com alterações é superior a 3.

Importante: Os exemplares de caça maior só podem ser comercializados depois de inspecionados num estabelecimento aprovado para a preparação de caça.

CAMPO GRANDE, 50 – 1700-093 LISBOA TELEF. 21 446 40 00 FAX. 21 446 40 99

Mod. 972 A / DGV

[illegible]

ANEXO IV: Requisição de análise das amostras recolhidas de animais de caça maior.



Ministério da Agricultura,
Mar, Ambiente e
Ordenamento do Território

TUBERCULOSE EM CAÇA MAIOR **VIGILÂNCIA EM ZONA EPIDEMIOLÓGICA DE** **RISCO**

DGV
Direcção-Geral
de Veterinária

► REQUISICÃO DE ANÁLISE Nº / ► C P / ► TBZRCM (Preenchimento completo obrigatório)

1. Dados da (s) amostra (s): (Preenchimento completo obrigatório)

► Data de colheita: / / Data de envio ao laboratório: / /
► N.º total de amostras recolhidas: ; Conservação da(s) amostra(s): Congelação: ☐; Refrigeração: ☐
► Espécie(s) animal em que foi efectuada a colheita: Veado: ☐; Corço: ☐; Gamo: ☐; Javali: ☐; Muflão: ☐
Destino das amostras: LNIV (Laboratório Nacional de Investigação Veterinária)

2. Motivo da colheita: (Preenchimento completo obrigatório seleccionando uma das opções propostas)

Deteção de lesões suspeitas de tuberculose em animal abatido em:
► Montaria: ☐; ► Batida: ☐; ► Acção de correcção de densidades populacionais: ☐

3. Exames pretendidos:

Histopatológico: ☒ Bacteriológico: ☒ Tipificação de *Mycobacterium*: ☒

4. Identificação relativa ao Médico Veterinário responsável pela colheita: (Preenchimento completo obrigatório)

► Nome: Cédula profissional n.º: N.º de contacto:

5. Destino dos resultados obtidos:

Original: DGV – DSSPA Cópia: DSVR do local em que decorreu a acção de caça (ponto 6)

6. Identificação do local em que decorreu a acção de caça: (Preenchimento completo obrigatório)

► Localidade: ► Freguesia: ► Concelho:
► DIV: ► DSVR:

7. Identificação da Zona de caça/entidade promotora da acção de caça: (Preenchimento completo obrigatório)

N.º da zona de caça: Denominação da zona de caça:
Nome da entidade gestora/ concessionária da zona de caça:
Endereço postal da entidade gestora/concessionária da zona de caça:
Endereço de e-mail da entidade gestora/concessionária da zona de caça:

ANEXO V: Requisição de análises para amostras recolhidas em bovinos submetidos a abate sanitário por tuberculose.



Ministério da
Agricultura,
do Desenvolvimento
Rural e das Pescas

**FOLHA DE REQUISICÃO DE ANÁLISES
PARA AMOSTRAS RECOLHIDAS EM BOVINOS
SUBMETIDOS A ABATE SANITÁRIO
POR TUBERCULOSE**

DGV
Direcção-Geral
de Veterinária

► REQUISICÃO DE ANÁLISE Nº /TBAS ► DIV: ► DSVR:

1. Dados da (s) amostra (s): (Preenchimento completo obrigatório)

► Data de colheita: / / Data de envio ao laboratório: / /
► N.º total de amostras recolhidas: ; ► Conservação da amostra : Congelação: ☐ Refrigeração: ☐
► Médico Veterinário responsável/Entidade oficial que efectuou a colheita:
Nome do Médico veterinário: DIV: DSVR:
Destino das amostras: INRB/ LNIV (Laboratório Nacional de Investigação Veterinária)

2. Motivo da colheita: (Preenchimento obrigatório)

► Controlo sanitário/Prova IDC realizada em: / /

3. Exames pretendidos:

Histopatológico: ☒ Bacteriológico: tipificação de *Mycobacterium*: ☒

4. Destino dos resultados dos exames efectuados:

Original: DGV – DSSPA

Cópia: DSVR da área da exploração de origem dos animais com colheita

5. Origem dos animais com colheita de amostras/Dados da exploração: (Preenchimento completo obrigatório)

► N.º Oficial (MOE): ► Detentor:
► Localidade: ► Freguesia: ► Concelho:
DIV: DSVR:



DGV
Direcção-Geral
de Veterinária

► REQUISICÃO DE ANÁLISE Nº /TBAS ► DIV: ► DSVR:

[illegible]

1. O presente modelo de requisição de análise consigna-se como modelo único homologado de requisição de análise, aplicável em abates sanitários por tuberculose, de bovinos provenientes de explorações em que não foram isoladas bactérias do género *Mycobacterium bovis* ou *tuberculosis*.
2. O n.º de requisição a atribuir corresponde a um n.º de serie anual de análises efectuadas em abate sanitário por tuberculose numa mesma DIV, sendo que cada requisição emitida documenta o envio das amostras recolhidas em animais de uma mesma exploração, submetidos a um abate sanitário num mesmo dia.
3. A DSVR/DIV requesitante corresponde à DSVR/DIV da área geográfica de localização da exploração de origem dos animais abatidos, como tal os dados descritos no ponto 5 devem coincidir com as referências do quadro inicial que identifica a requisição emitida.
4. A DIV requesitante deverá proceder à emissão com preenchimento prévio do quadro inicial e dos campos 2 e 5 da presente requisição, de forma a que a mesma constitua parte da documentação apresentada no estabelecimento de abate para realização do respectivo abate sanitário, e, ao posterior arquivamento das cópias de todas as requisições remetidas ao Laboratório.
5. A entidade executora da recolha de amostras caba o preenchimento dos campos 1 e 6 da requisição emitida.
6. O n.º total de amostras recolhidas (campo 1) refere-se ao nº de animais com colheita de um mesmo detentor (nº de amostras colhidas = nº total de animais com colheitas de um mesmo detentor) abatidos no mesmo dia.
7. Cada amostra recolhida num mesmo animal é obrigatoriamente identificadas através do n.º da respectiva marca auricular, identificação do material recolhido e marca oficial de exploração de origem, o total das amostras correspondentes a uma requisição será acondicionado numa embalagem conjunta referenciada pela MOE da exploração de origem, nome do respectivo detentor, data de colheita e n.º de requisição.
8. A conservação da amostra por refrigeração implica a entrega em laboratório no próprio dia da colheita.
9. O laboratório oficial para efectuar as análises requisitadas é o INRB/LNIV.
10. A emissão de resultados para a DSVR da área de localização da exploração de origem dos animais abatidos considera-se destino prioritário dos resultados obtidos.
11. Sempre que o resultado do exame histopatológico das amostras recolhidas, descrever lesões características de tuberculose, o mesmo deverá ser remetido para a referida DSVR logo que concluir, seguindo à posteriori o respectivo resultado bacteriológico.
12. Todos os dados precedidos pelo símbolo ► devem constar do boletim de resultados de análise.
13. Sempre que n.º de animais com colheita exceder a listagem do ponto 7 será anexada nova página 2 de 2 em referência à mesma requisição de análise.
14. O custo das análises realizadas deve ser debitado à Direcção Geral de Veterinária para o endereço em rodapé e NIF 60004523

- O preenchimento integral com letra legível de todos os campos referidos como preenchimento obrigatório, a identificação conforme de cada amostra individual a datação do documento e a assinatura do médico veterinário responsável pela recolha das amostras são condição imprescindível e determinante para a recepção em laboratório.
- O presente modelo de requisição de análise encontra-se disponível na página eletrónica da DGV

Data: de de

Assinatura e carimbo do medico veterinário responsável pela colheita: